

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of
Jockers et al.

Examiner: To Be Assigned

Art Unit: To Be Assigned

Application No.: To Be Assigned

Filed: **Herewith**

Title: **Oligonucleotides Inhibant L'Expression De
La Proteine OB-RGRP Et Procede De
Detection De Composes Modifiant
L'Interaction Entre Les Proteines De La
Famille De OB-RGRP Et Le Recepteur
De La Leptine**

I hereby certify that this correspondence is being
deposited with the United States Postal Service as
Express Mail in an envelope addressed to Commissioner
for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-
1450,, on

Feb. 9, 2004
Date of Deposit

Delia Congher
Signature

EL964838919US
Express Mail No.

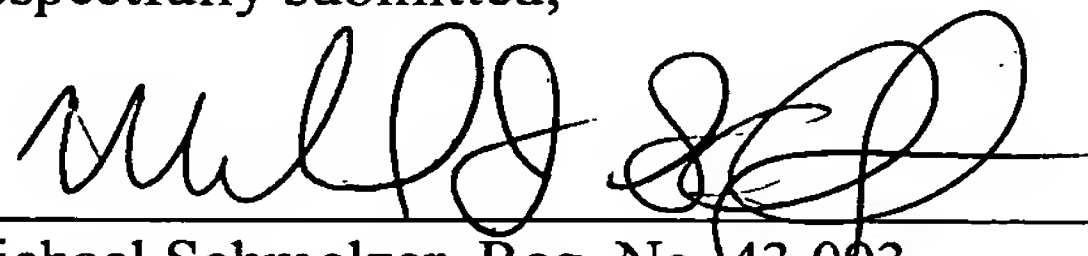
CLAIM FOR FOREIGN PRIORITY
UNDER 35 U.S.C. 119

Mail Stop Patent Applications
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

In accordance with the provisions of the International Convention for the Protection of
Industrial Property and the provisions of 35 U.S.C. 119, the priority date of February 10, 2003 is
hereby claimed.

Priority is based upon the enclosed certified copy of the application on the above-identified
invention which was first filed in France on February 10, 2003 as 0301543 Patent Application
Number.

Respectfully submitted,


Michael Schmelzer, Reg. No. 43,093
Attorney/Agent for Applicant

Aventis Pharmaceuticals Inc.
Patent Department
Route #202-206 / P.O. Box 6800
Bridgewater, NJ 08807-0800
Telephone (908) 231-4797
Telefax (908) 231-2626

Aventis Docket No. FRAV2003/0005 US NP



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 NOV. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', is written over a horizontal line.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Remplir impérativement la 2ème page.

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 W / 190600

10 FEV 2003 REMISE DES PIÈCES DATE LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 1 0 FEV. 2003 0301543		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE AVENTIS PHARMA S.A. Direction brevets - Tri K2/144 20 avenue Raymond Aron 92160 ANTONY CEDEX FRANCE	
V s références pour ce dossier (facultatif) FRAV2003/0005			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date ____/____/____ N° _____ Date ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) OLIGONUCLEOTIDE ANTISENS INHIBANT L'EXPRESSION DE LA PROTEINE OB-RGRP ET PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES MODIFIANT L'INTERACTION ENTRE LA FAMILLE DE LA PROTEINE OB-RGRP ET LE RECEPTEUR DE LA LEPTINE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date ____/____/____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		AVENTIS PHARMA S.A.	
Prénoms			
Forme juridique		S.A.	
N° SIREN		3 . 0 . 4 . 4 . 6 . 3 . 2 . 8 . 4	
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron	
	Code postal et ville	92160	ANTONY
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		01.55.71.71.71	
N° de télécopie (facultatif)		01.47.02.50.14	
Adresse électronique (facultatif)		WWW.AVENTIS.COM	



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 10 FEV 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI 0301543		DB 540 W / 190600	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>			FRAV2003/0005		
6 MANDATAIRE					
Nom			BOUVET		
Prénom			Philippe		
Cabinet ou Société			AVENTIS PHARMA S.A.		
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			PG8850		
Adresse	Rue	20 avenue Raymond Aron			
	Code postal et ville	92160	ANTONY		
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>			01.55.71.76.92		
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>			01.55.71.72.91		
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>			philippe.bouvet@aventis.com		
7 INVENTEUR (S)					
Les inventeurs sont les demandeurs			<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée		
8 RAPPORT DE RECHERCHE			Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)		
Établissement immédiat ou établissement différé			<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Paiement échelonné de la redevance			Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non		
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES			Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i>		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			1 page		
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) BOUVET Philippe				VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

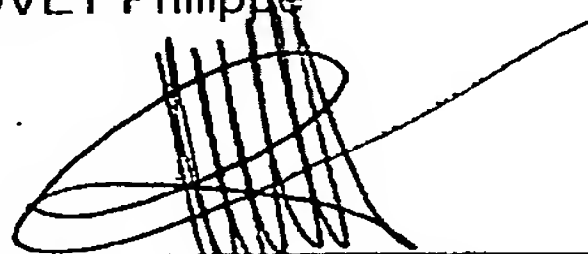
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1... / 1...

REMISE DES PIÈCES DATE 10 FEV 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI 0301543		Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire	
V s références pour ce dossier (facultatif)		FRAV2003/0005			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="text"/> Pays ou organisation Date <input type="text"/> / <input type="text"/> / <input type="text"/> N° <input type="text"/>			
5 DEMANDEUR					
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)			
Prénoms					
Forme juridique					
N° SIREN		<input type="text"/>			
Code APE-NAF		<input type="text"/>			
Adresse	Rue	101 rue de Tolbiac			
	Code postal et ville	75654	PARIS CEDEX 13		
Pays		FRANCE			
Nationalité		Française			
N° de téléphone (facultatif)					
N° de télécopie (facultatif)					
Adresse électronique (facultatif)					
5 DEMANDEUR					
Nom ou dénomination sociale					
Prénoms					
Forme juridique					
N° SIREN		<input type="text"/>			
Code APE-NAF		<input type="text"/>			
Adresse	Rue				
	Code postal et ville				
Pays					
Nationalité					
N° de téléphone (facultatif)					
N° de télécopie (facultatif)					
Adresse électronique (facultatif)					
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		BOUVET Philippe 		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

OLIGONUCLEOTIDE ANTISENS INHIBANT L'EXPRESSION DE LA PROTEINE OB-RGRP ET PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES MODIFIANT L'INTERACTION ENTRE LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE OB-RGRP ET LE RECEPTEUR DE LA LEPTINE

5

La présente demande a pour objet des oligonucléotides antisens inhibant l'expression de la protéine OB-RGRP et leurs utilisations pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.

10

Elle est en outre relative à un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mise en œuvre du transfert d'énergie entre d'une part des protéines de fusion composées de récepteurs de la leptine et de protéines donneurs ou accepteurs d'énergie et d'autre part de des protéines de fusion composées de OB-RGRP ou de MYO47 et de protéines donneurs ou accepteurs d'énergie.

15

Elle a de plus pour objets des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé.

20

La leptine est une protéine de 16 kDa sécrétée principalement par le tissu adipeux; et se liant à un récepteur (OB-R) appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines. Cinq isoformes membranaires de ce récepteur ont été identifiées, et dérivent de l'épissage alternatif d'un même gène. Ces isoformes qui possèdent le même domaine extracellulaire et transmembranaire, sont caractérisées par des domaines intracellulaires de tailles variables (Tartaglia et al. (1995) Cell 83, 1263-1271). Une forme soluble du récepteur a aussi été identifiée et provient d'un épissage alternatif ou d'un clivage protéolytique du domaine extracellulaire des formes membranaires. La

25

forme courte du récepteur (OB-Rs) qui semble impliquée dans le transport de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique est l'isoforme la plus exprimée. La forme longue (OB-RI) est seulement exprimée dans quelques tissus comme l'hypothalamus et semble responsable de la plupart des effets biologiques de la leptine (Sweeney, G. (2002) Cell Signal 14, 655-663). La leptine et son récepteur ont été l'objet d'une attention particulière à cause de leur implication dans la régulation de la balance énergétique, du métabolisme, et dans la réponse neuroendocrine à la prise alimentaire. Récemment, il a été

30

montré que la leptine est aussi impliquée dans des fonctions additionnelles importantes comme la régulation de la masse osseuse, l'angiogénèse, la formation de thrombus, la maturation sexuelle, l'hématopoïèse, la régulation de l'immunité et de l'inflammation, le développement fœtal et le cancer. L'administration de leptine chez des organismes déficients en leptine comme les souris (ob/ob) et certains individus humains provoque une diminution de la

40

masse de lipide dans divers tissus comme le foie et le tissu adipeux (Halaas et al. (1995) Science 269, 543-546, Pelleymounter et al. (1995) Science 269, 540-543, Campfield et al. (1995) Science 269, 546-549, Farooqi et al. (1999) N Engl J Med 341, 879-884). Ce traitement par la leptine améliore aussi la sensibilité à l'insuline et diminue la masse grasse chez la souris et l'homme

45

présentant une lipodystrophie (Shimomura et al. (1999) Nature 401, 73-76, Oral et al. (2002) New England Journal of Medicine 346, 570-578, Petersen et al. (2002) J Clin Invest 109, 1345-1350). Les personnes obèses sont généralement résistantes à la leptine. Les raisons de cette résistance sont encore mal comprises mais plusieurs mécanismes ont été suggérés : un défaut

de transport de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique, un défaut d'activation des OB-R ou de la signalisation de ces récepteurs; et la surexpression de régulateurs négatifs comme SOCS3 et PTP-1B Bjorbaek et al. (2000) J Biol Chem 275, 40649-40657, Cheng et al. (2002) Developmental Cell 2, 497-503, Cook et Unger (2002) Developmental Cell 2, 385-387. La compréhension des mécanismes de la résistance à la leptine requiert une caractérisation plus détaillée des mécanismes impliqués dans l'activation des OB-R.

OB-R est constitutivement associé à la janus kinase 2 (JAK2). La liaison de JAK2 au récepteur est critique pour la signalisation par les OB-R et a été proposée comme étant impliquée dans la stabilisation des dimères de récepteurs OB-R. L'activation par des agonistes provoquerait un changement de conformation dans la région juxta membranaire de la queue cytoplasmique des OB-R. JAK2, qui est constitutivement reliée au motif box1 dans cette région est activée par autophosphorylation puis phosphoryle le récepteur OB-Rl mais pas OB-Rs. La phosphorylation d'OB-Rl permet l'ancrage de protéines STAT qui se lient au récepteur et sont activées par phosphorylation sur tyrosine. Les protéines STAT activées dimérisent et transloquent dans le noyau pour stimuler la transcription de gènes via des éléments de réponse aux STAT Tartaglia (1997) J Biol Chem 272, 6093-6096.

Récemment, un second promoteur pour le récepteur de la leptine a été découvert. De façon intéressante, un second transcrit est co-exprimé avec les messagers des OB-R depuis ce promoteur. Ce transcrit a été observé dans plusieurs espèces comme la souris, le rat, l'homme, la levure et *C. elegans* Bailleul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25, 2752-2758. Des expériences d'hybridation *in situ* confirment la co-expression des OB-R et du gène associé dans le cerveau de la souris y compris les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du poids corporel (Mercer et al., J Neuroendocrinol 2000 Jul;12(7):649-55). La protéine correspondante est composée de 131 acides aminés et est appelée OB-R-gene related protein (OB-RGRP). Cette protéine a fait l'objet de la demande de brevet WO98/05792.

Le fait qu'OB-RGRP soit exprimée chez la levure et le nématode, organismes dépourvus de récepteurs de la leptine, indique un rôle plus général pour OB-RGRP, supporté par la délétion de cette protéine chez la levure qui provoque un défaut de transport des protéines du golgi vers les vacuoles Belgareh-Touze et al. (2002) Molecular Biology Of The Cell 13, 1694-1708).

En 2001, un ADNc appelé MY047, a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain (16). La fonction de la protéine correspondante est encore inconnue. MY047 a 68 % d'homologie avec OB-RGRP suggérant que ces deux protéines appartiennent à la même famille. L'analyse des séquences disponibles du projet de séquençage du génome humain montre qu'il n'existe aucun autre homologue.

Les demandeurs se sont attachés à déterminer le rôle de la OB-RGRP et ses relations avec les récepteurs de la leptine.

Ils ont ainsi montré la spécificité des interactions entre la OB-RGRP et le récepteur OBRs.

Ils ont en outre montré qu'il était possible de modifier spécifiquement l'expression des récepteurs de la leptine à la surface cellulaire à l'aide d'oligonucléotides antisens dirigés contre la protéine associée au gène des récepteurs de la leptine (OB-RGRP).

La présente a donc pour objet des oligonucléotides éventuellement modifiés comprenant de 8 à 50 nucléotides qui hybrident de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 1 et inhibent l'expression de OB-RGRP.

Avantageusement, ces oligonucléotides favorisent l'expression des récepteurs de la leptine à la surface cellulaire.

Préférentiellement ces oligonucléotides sont des antisens.

Préférentiellement ces oligonucléotides sont caractérisés en ce qu'il comprennent une séquence présentant une identité d'au moins 60%, 70%, 80% ou 90% avec la séquence SEQ ID N° 2.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux ces oligonucléotides sont caractérisés en ce que des nucléotides sont thioestérifiés.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux ces oligonucléotides sont caractérisés en ce que des nucléotides sont 2' O-méthylés.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux ces oligonucléotides sont caractérisés en ce qu'il présentent un résidu triéthylèneglycol à leurs extrémités 3'.

Bien que la forme la plus usitée de composés antisens se présente sous la forme d'oligonucléotides antisens, la présente invention inclut les dérivés d'oligonucléotides et les composés mimant leur structure tels que ceux décrits ci-après, sans que cette liste soit limitative. Les composés antisens en accord avec cette invention comprennent de préférence, de 8 à 50 nucléobases (c'est-à-dire sont des oligomères formés de 8 à 50 unités nucléotidiques). Les composés antisens particulièrement visés sont les oligonucléotides antisens, plus spécialement ceux qui sont formés d'environ 12 à 30 nucléobases. Les composés antisens comprennent les ribozymes, les oligozymes et autres ARN catalytiques courts ou oligonucléotides catalytiques qui s'hybrident avec l'acide nucléique cible et modulent son expression. Un nucléoside est une combinaison d'une base azotée et d'un sucre. La base d'un nucléoside est généralement une base azotée hétérocyclique. Les deux types de base hétérocycliques les plus communs sont les bases puriques et pyrimidiques. Les nucléotides sont des nucléosides qui portent un groupement phosphate lié de manière covalente au sucre du nucléoside. Pour les nucléosides comportant un pentanofurannose, le phosphate peut être lié à l'hydroxyle en position 2', 3' ou 5' du sucre. La formation de nucléotides provient de l'attachement covalent du groupement phosphate à deux nucléosides adjacents ce qui permet de proche en proche l'obtention d'un oligomère linéaire. Les deux extrémités d'un tel polymère linéaire peuvent à leur tour se joindre pour former une structure circulaire, mais la structure ouverte est

généralement préférée. Dans la structure nucléotidique, les groupements phosphate sont considérés comme formant le squelette internucléosidique de l'oligonucléotide. La liaison normale dans le squelette d'ARN ou d'ADN est un lien phosphodiester 3'-5'. Des exemples spécifiques de composés antisens utilisables dans cette invention incluent des oligonucléotides contenant une ossature modifiée ou des liaisons internucléosidiques non-naturelles. Ainsi des oligonucléotides à ossature modifiée comprennent ceux qui conservent un atome de phosphate dans leur squelette et ceux qui en sont dépourvus. Pour les besoins de la présente invention, des oligonucléotides modifiés ne possédant pas d'atome de phosphore dans leur liaison internucléosidique peuvent malgré tout être considérés comme des oligonucléotides. L'ossature de ces oligonucléotides modifiés peut comprendre par exemple des groupements phosphorothioates, phosphorothioates chiraux, phosphorodithioates, phosphotriesters, aminoalkylphosphotriesters, méthyl et autres alkyl phosphonates y compris les 3'-alkylène phosphonates, 5'-alkylène phosphonates et phosphonates chiraux, des groupements phosphinates, phosphoramidates y compris 3'-amino phosphoramidate and aminoalkylphosphoramidates, thionoalkylphosphonates, thionoalkylphosphotriesters, sélénophosphates and borophosphates formant des liaisons normales, 3'-5', et leurs analogues formant des liaisons 2'-5', ainsi que ceux qui présentent une polarité inversée, c'est-à-dire comprenant au moins une liaison internucléosidique de type 3'-3', 5'-5' ou 2'-2'. La forme d'oligonucléotides possédant une polarité inversée préférentiellement utilisée est celle possédant la première liaison internucléosidique en 3' est de type 3'-3'. Ceci correspond à un seul résidu nucléosidique inversé, qui peut par ailleurs être abasique, c'est-à-dire dans lequel la base azotée hétérocyclique est manquante ou remplacée par un groupement hydroxyle. Les diverses formes (salines ou acide libre) sont incluses dans le champ de cette invention.

L'ossature des oligonucléotides modifiés dépourvus d'atome de phosphore est préférentiellement formée de courtes chaînes alkyles ou cycloalkyles, y compris leurs dérivés comportant un ou plusieurs hétéroatomes, servant de liaison internucléosidique. Ce type d'ossature peut être à base de liaison morpholino (constituée en partie par le sucre du nucléoside), de siloxane, de formacétyle et thioformacétyle, de méthylène formacétyle et méthylène thioformacétyle, de riboacétyle, d'alcènes, de sulfamates, de sulfonate et sulfonamide, de méthylène imine et méthylène hydrazine, d'amide, et de tout autre groupement comportant divers atomes d'azote, de soufre et d'oxygène ou des groupes méthyle.

Pour d'autres analogues d'oligonucléotides, le sucre et la liaison internucléosidique (c'est-à-dire l'ossature) sont à la fois remplacés dans la structure nucléotidique par de nouveaux groupes. La base azotée hétérocyclique est conservée pour assurer l'hybridation avec l'acide nucléique cible. De tels composés oligomères, les PNA (pour Peptide Nucleic Acid), ont montré une excellente capacité d'hybridation. Dans ces composés, le squelette de l'oligonucléotide est remplacé par une ossature à base d'amide, en particulier par l'aminoéthyl glycine, greffée directement ou indirectement sur les bases azotées. De plus amples renseignements sur ces PNA peuvent être trouvés dans Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497.

L'invention incorpore plus particulièrement des oligonucléotides à ossature phosphorothioate, amide et morpholine, et les oligonucléosides à squelette à hétéroatomes, plus précisément :

-CH₂-NH-O-CH₂-

5 -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (dénommé squelette méthylène-(méthylimino) ou MMI)

-CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-

-CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-

-O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (dans lequel le pont phosphodiester est : O-P-O-CH₂).

10 La modification des oligonucléotides peut également porter sur les sucres : les substitutions préférées sont en position 2' (F; dérivés O-, N- ou S-alcanes, O-, N- ou S-alcènes ou O-, N- ou S-alcynes de longueur C1 à C11, substitués ou non) en particulier, les dérivés préférés sont :

O-[(CH₂)_nO]_m-CH₃

15 O-(CH₂)_n-O-CH₃

O-(CH₂)_n-NH₂

O-(CH₂)_n-CH₃

O-(CH₂)_n-O-NH₂

O-(CH₂)_n-O-N[(CH₂)_n-CH₃]₂

20 où n et m varient de 1 à 10.

D'autres modifications de la position 2' incluent les groupes suivants : chaînes aliphatiques substituées ou non de longueur C1 à C10, aryles, aryles-alkyles et alkyles-aryles; -SH, -SCH₃, -OCN, -Cl, -Br, -CN, -CF₃, -OCF₃, -SO₂CH₃, -ONO₂, -NO₂, -N₃, -NH₂; silyles substitués; groupement "rapporteur"; groupement intercaleur; groupement de clivage de l'ARN; groupement pour améliorer les capacités pharmacodynamiques d'un oligonucléotide. Les modifications préférées incluent les groupements :

2'-méthoxyéthoxy (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, également appelé 2'-O-(2-méthoxyéthyl) ou 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78f 486-504)

30 2'-diméthylaminooxyéthoxy (O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, également appelé 2'-DMAOE

2'-diméthylaminoéthoxyéthoxy (2'-O-CH₂OCH₂-N(CH₂)₂, également appelé 2'-diméthylaminoéthoxyéthyl or 2'-DMAEOE).

35 Une autre modification intéressante conduit à la formation de LNA (Locked Nucleic Acids) dans lesquels l'hydroxyle en position 2' est lié au carbone en position 3' ou 4' du sucre, formant alors un sucre à structure bicyclique. Le pontage préféré se fait par un lien méthyle ou éthyle entre l'oxygène 2' et le carbone en 4'.

D autres substitutions préférées en position 2' incluent :

-O-CH₃ (2'-méthoxy)

40 -O-(CH₂)₃-NH₂ (2'-aminopropoxy)

-CH₂-CH=CH₂ (2'-allyle)

-O-CH₂-CH=CH₂ (2'-O-allyle)

-F (2' fluoro).

45 Ces modifications en 2' peuvent se présenter en position ribo (bas) ou arabino (haut). Le substituant 2' fluoro est le préféré en position arabino.

Des modifications similaires peuvent être faite sur d'autres positions, en particulier en position 3' du sucre du nucléotide en extrémité 3'-terminale ou dans les oligonucléotides à ossature 2'-5', et en position 5' du sucre en extrémité 5'-terminale. Les sucres des oligonucléotides peuvent également être remplacés par

des analogues (par exemple un cyclobutyl peut être substitué à un pentofurranyl).

Les oligonucléotides peuvent aussi comporter des modifications ou substitutions
 5 au niveau des nucléobases (bases hétérocycliques azotées appelées "bases" par
 l'homme de l'art). Les bases naturelles (non modifiées) sont les purines (adénine
 A et guanine G) et les pyrimidines (cytosine C, thymine T et uracile U). Parmi les
 bases modifiées sont incluses des molécules naturelles ou synthétiques telles que
 10 5-méthylcytosine, 5-hydroxyméthylcytosine, xanthine, hypoxanthine, 2-
 aminoadénine; 6-méthyl, 2-méthyl et autres dérivés alkylés des bases puriques (A
 et G); dérivé 2-thio (C, T et U); dérivé 5-halo (U, C); dérivé 5-propynyl (U et C)
 cytosine; dérivé 6-azo (U, T et C); 5-uracile; 4-thiouracile; 8-halo, 8-amino, 8-thiol,
 8-thioalkyl, 8-hydroxyl autres adénines et guanines substituées en position 8; 5-
 halo (en particulier 5-bromo), 5-trifluorométhyl et autres uraciles and cytosines
 15 substituées en position 5; 7-méthylguanine and 7-méthyladénine; 2-fluoro-
 adénine; 2-amino-adénine; 8-azaguanine et 8-azaadénine; 7-déazaguanine et 7-
 déazaadénine; 3-déazaguanine et 3-déazaadénine. Dans les autres bases
 modifiées, on trouve les pyrimidines tricycliques telles que phénoxazine
 cytidine(1H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-one), phénothiazine cytidine
 20 (1H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzothiazin-2(3H)-one), phénoxazine cytidine
 substituées (comme la 9-(2-aminoethoxy)-H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-
 one), carbazole cytidine (2H-pyrimido[4,5-b]-indol-2-one).

Les bases modifiées comprennent les composés dont l'hétérocycle purique ou
 pyrimidique est remplacé par un autre hétérocycle par exemple 7-déaza-adénine,
 25 7-déazaguanosine, 2-aminopyridine ou 2-pyridone (The Concise Encyclopedia Of
 Polymer Science And Engineering, pages 858-859" Kroschwitz, J.I., ed. John
 Wiley & Sons, 1990; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition,
 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications,
 pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993). Certaines de
 30 ces bases modifiées peuvent être d'un grand intérêt pour augmenter l'affinité des
 composés oligomériques de l'invention, comme les pyrimidines substituées en
 position 5, les azapyrimidines, les purines N- et O- substituées (telles que la 2-
 aminopropyladénine, la 5-propynyl uracile, la 5-propynyl cytosine). Les 5-
 méthylcytosines substituées ont un effet positif sur la stabilité des duplex
 35 oligomères-acides nucléiques (Sanghvi Y.S. et Crooke S.T., and Lebleu, B., eds. f
 Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-
 278) et sont la substitution préférée, en particulier en combinaison avec les
 modifications 2'-méthoxyéthyl des sucres.

40 Préférentiellement ces oligonucléotides sont sous la forme simple brin.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux ces
 oligonucléotides comprennent une séquence présentant une identité d'au
 moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en
 45 positions 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont
 thioestérifiés.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux ces
 oligonucléotides comprennent une séquence présentant une identité d'au

moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 et/ou 20, dans le sens 5' vers 3', sont 2' O-méthylés.

5 Préférentiellement les oligonucléotides selon la présente invention sont des ADN.

10 La présente invention a encore pour objet des oligonucléotides de type ARNi (Acide Ribonucléique Interférant) comprenant de 15 à 25 nucléotides caractérisés en ce qu'ils hybrident de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 21 et inhibent l'expression de OB-RGRP.

15 Préférentiellement de tels ARNi comprennent 17 ou 19 nucléotides pris en continu dans la séquence SEQ ID N° 21, ou dans sa séquence complémentaire. Des nucléotides A(A/G) et (C/T)T peuvent être ajoutés respectivement en 5' et en 3' de cette séquence de 17 ou 19 nucléotides. D'autres types de résidus ou groupes chimiques peuvent néanmoins être ajoutés à ces deux extrémités, pour autant qu'ils ne diminuent pas l'activité des antisens.

20 Les modifications de nucléotides décrites pour les antisens sont aussi possibles pour ceux entrant dans la composition des sARNi.

La présente invention inclut également toutes modifications des antisens ou des ARNi, visant à augmenter la résistance de ces composés aux nucléases cellulaires, ou leur pénétration dans les cellules et/ou leur efficacité dans le ciblage de la séquence d'OB-RGRP.

25

Lorsqu'ils sont des ADN, les oligonucléotides selon la présente invention peuvent être réalisés commodément et en routine par la technique bien connue de la synthèse en phase solide. L'équipement pour une telle synthèse est vendu par
30 différentes sociétés spécialisées telles que Applied Biosystems (Foster City, CA). La synthèse des antisens dans la présente invention a fait appel à une synthèse chimique sur un support adapté selon les méthodes connues de l'homme du métier, en particulier décrites par E. Uhlmann, A. Peyman, A. Rytte, A. Schmidt and E. Buddecke (1999, Methods in Enzymology 313: 268-284) et par E. Uhlmann
35 (Recent advances in the medicinal chemistry of antisense oligonucleotides, Current Opinion of Drug Discovery and Development 3: 203-213, 2000). Tout autre procédé de synthèse connu de l'homme du métier peut aussi être employé.

40 Lorsqu'ils sont des ARNi les oligonucléotides selon la présente invention peuvent être synthétisés par synthèse chimique, lorsqu'il s'agit de ARNi synthétiques, ou exprimés in situ à l'aide de vecteurs exprimant de tels oligonucléotides.

Les sARNi (petits ARNi) peuvent être obtenus auprès de différents fournisseurs comme Proligo (Proligo France SAS 1 rue Robert et Sonia Delaunay 75011 Paris) Dharmacon (Dharmacon, Inc. 1376 Miners Drive #101 Lafayette, CO 80026) et
45 Ambion (Ambion (Europe) Ltd. Ermine Business Park Spitfire Close Huntingdon, Cambridgeshire PE29 6XY United Kingdom), ou peuvent être synthétisés à partir de kits commercialisés par différentes sociétés comme Dharmacon et Ambion. Préférentiellement les ARNi selon la présente invention sont sous forme double brin.

Après synthèse les ARNi sont tout d'abord repris dans de l'eau dépourvue de RNAses. L'appariement des deux molécules simple brin peut être réalisée comme suit : 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de chaque brin est mélangé dans le tampon d'appariement (100 mmol.L^{-1} d'acétate de potassium, 30 mmol.L^{-1} d'HEPES-KOH pH 7,4, 2 mmol.L^{-1} d'acétate de magnésium) puis chauffé à 90°C pendant 1 min suivit par une incubation d'1 h à 37°C.

La transfection des ARNis peut se faire par le même protocole que pour la transfection des antisens.

Une alternative pour le ARNi est l'utilisation de vecteurs permettant la synthèse d'ARN antisens spécifiques du gène à éteindre et qui vont s'apparier dans les cellules transfectées pour donner un ARNis. Un premier système de vecteur permet l'expression d'une séquence antisens par deux promoteurs en sens inverse, de chaque coté de cette séquence, donnant naissance à deux ARN complémentaires qui vont s'apparier dans les cellules transfectées et donner un ARNis. Un autre système de vecteur met en jeu la synthèse d'un ARN présentant la séquence de l'antisens suivie de la séquence sens, espacée par quelques nucléotides, qui va créer une structure d'ARN en épingle à cheveu, qui va être clivée dans les cellules transfectées pour donner un ARNis. La transfection de ces vecteurs s'effectue de manière classique comme décrit ci-avant pour les différents ADN. L'obtention de lignées stables qui présentent une extinction du gène cible est réalisable par une sélection par antibiotique classiquement utilisée pour l'obtention de lignées.

De manière générale, l'homme du métier peut se référer pour les ARNi aux publications suivantes : Elbashir S.M. et al. (2001, *Nature* **411**: 494-498), Elbashir S.M. Lendeckel W. and Tuschl T. (2001, *Genes & Dev.* **15**:188-200) et Masters J.R., et al. (2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8012-8017).

Des vecteurs permettant l'expression des ARNi peuvent être obtenus comme décrit par Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. (2002, *Science* **296**: 550-553) et Yu J.Y., DeRuiter S.L., and Turner D. (2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6047-6052).

De tels vecteurs, ainsi que des cellules contenant de tels vecteurs sont des objets de la présente demande.

La présente a encore pour objet des médicaments contenant de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules et des compositions pharmaceutiques contenant une quantité pharmacologiquement active de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules et des excipients pharmaceutiquement acceptables.

Un autre objet de la présente invention est l'utilisation de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules pour la fabrication d'un médicament pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.

Elle a de plus pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine consistant à administrer de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules à un patient atteint par la dite maladie.

5. Un autre objet de l'invention est un procédé de détermination de la modification de l'interaction entre la OB-RGRP ou la protéine MYO47, ou une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec cette protéine ou avec la protéine MYO47, et le récepteur de la leptine par un composé.

10

Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé, ainsi qu'à des acides nucléiques codant ces protéines.

15

Elle a de plus pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine consistant à administrer un ligand sélectionné par le procédé défini ci-dessus à un patient atteint par la dite maladie.

20

Un premier objet de la présente invention est donc une protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'une séquence présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4, ou la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de la séquence SEQ ID N°16, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.

25

Les protéines de fusion selon la présente invention sont composées en substance d'une partie correspondant à une partie ou la totalité d'une séquence présentant une identité d'au moins 65% préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%, avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de la séquence SEQ ID N°16, et d'une partie correspondant à une protéine donneur ou accepteur d'énergie. Elles peuvent néanmoins comprendre d'autres séquences d'acides aminés, issues d'autres protéines, telles que des séquences signal.

35

De manière avantageuse la protéine donneur d'énergie est la luciférase de Renilla. Elle peut néanmoins être toute autre protéine donneur d'énergie telle que le spectre d'émission du donneur chevauche suffisamment le spectre d'excitation de l'accepteur pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les deux partenaires. Elle peut ainsi être la GFP, si le transfert d'énergie est le FRET, ou encore l'aequorine si le transfert d'énergie est le CRET. L'aequorine peut être obtenue et utilisée comme décrit dans la demande de brevet EP0 187 519, ou dans l'article de Inouye et al. (PNAS USA 82 : 3154-3158 (1985)).

40

La protéine fluorescente accepteur d'énergie est quant à elle préférentiellement la DsRed, la GFP ou un mutant de cette protéine, tel que la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, la Topaz, ou la GFP₁₀.

45

Elle peut néanmoins être toute autre protéine fluorescente accepteur d'énergie telle que le spectre d'excitation de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur se chevauchent suffisamment pour permettre un transfert d'énergie efficace entre

les deux partenaires.

Ces protéines sont connues de l'homme du métier qui peut trouver leurs séquences dans la littérature, notamment dans la revue de Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)). En particulier la GFP est décrite par Tsien (Annu. Rev. Biochem. 67 : 509-544 (1998)) et son clonage par Prasher et al. (Gene 111 : 229-233 (1992)). Le clonage de la DsRed est quant à lui décrit par Matz et al. (Nat. Biotechnol. 17 : 969-973 (1999)). Pour la Rluc, l'homme du métier peut se référer à Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)) ou encore à Lorenz et al. (PNAS 88: 4438-4442 (1991)).

De manière particulièrement avantageuse les protéines de fusion donneur et accepteur présentent l'une des séquences SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°12, SEQID N°14, SEQID N°18 ou SEQID N°20 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

D'autres objets de la présente invention sont des acides nucléiques codant pour ces protéines. De tels acides nucléiques peuvent être des ADN complémentaires ou génomiques, ou des ARN. Ces acides nucléiques ou polynucléotides peuvent être sous forme simple chaîne ou sous la forme de duplex.

Ils sont de manière particulièrement avantageuse des ADN complémentaires.

De manière préférentielle l'invention a pour objet un acide nucléique ayant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%, d'identité en nucléotides avec un acide nucléique de séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°11, SEQID N°13, SEQID N°17 ou SEQID N°19.

Selon encore un autre aspect, l'invention est relative à un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique tel que défini ci-avant, et plus particulièrement un acide nucléique de séquences nucléotidiques SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°11, SEQID N°13, SEQID N°17 ou SEQID N°19, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptide dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est observé

pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de positions auquel il y a identité entre les deux bases ou résidus d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans le package de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel BLAST (versions BLAST 1.4.9 de mars 1996, BLAST 2.0.4 de février 1998 et BLAST 2.0.6 de septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut (S. F Altschul et al, J. Mol. Biol. 1990 215 : 403-410, S. F Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997 25 : 3389-3402). Blast recherche des séquences similaires/homologues à une séquence « requête » de référence, à l'aide de l'algorithme d'Altschul et al. La séquence requête et les bases de données utilisées peuvent être peptidiques ou nucléiques, toute combinaison étant possible.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions suivantes :

1- Compétition des membranes et PRE HYBRIDATION :

- Mélanger : 40 µl ADN sperme de saumon (10mg/ml) + 40 µl ADN placentaire humain (10mg/ml)

- Dénaturer 5 min à 96°C, puis plonger dans la glace le mélange.

- Oter le SSC 2X et verser 4 ml de mix formamide dans le tube d'hybridation contenant les membranes.

- Ajouter le mélange des deux ADNs dénaturés.

- Incubation à 42°C pendant 5 à 6 heures, avec rotation.

2- Compétition de la sonde marquée :

- Ajouter à la sonde marquée et purifiée 10 à 50 µl ADN Cot I, selon la quantité de répétitions.

- Dénaturer 7 à 10 mn à 95°C.

- Incuber à 65°C pendant 2 à 5 heures.

3- Hybridation :

- Oter le mix de pré hybridation.

- Mélanger 40 µl ADN sperme de saumon + 40 µl ADN placentaire humain ; dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace.

- Ajouter dans le tube d'hybridation 4 ml de mix formamide, le mélange des deux ADN et la sonde marquée/ADN Cot I dénaturée.

- Incuber 15 à 20 heures à 42°C; avec rotation.

4- Lavages :

- Un lavage à température ambiante dans du SSC 2X, pour rincer.

- 2 fois 5 minutes à température ambiante SSC 2X et SDS 0,1% à 65°C.

- 2 fois 15 minutes à 65°C SSC 1X et SDS 0,1% à 65°C.

Envelopper les membranes dans du Saran et exposer.

Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une

longueur variable de 20 nucléotides à plusieurs centaines de nucléotides.

Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon des techniques connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985, "Nucleic acid hybridization : a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford) ou encore dans l'ouvrage de F.AUSUBEL et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).

Les protéines objets de la présente invention peuvent être obtenues par tous moyens connus de l'homme du métier. Elles sont néanmoins avantageusement obtenues par expression des acides nucléiques tels que décrits ci-dessus, codant pour ces protéines, éventuellement insérés dans des vecteurs d'expression, dans des cellules avantageusement choisies, suivie éventuellement par une extraction et une purification qui peut être totale ou partielle.

L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'invention.

Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprendra un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

a) un acide nucléique codant pour une protéine ayant au moins 65% d'identité en acides aminés avec une séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°18 ou SEQID N°20 ou un fragment peptidique ou un variant de cette dernière ;

b) un acide nucléique comprenant un polynucléotide ayant une séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19, ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

c) un acide nucléique ayant au moins 65% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique ayant une séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19 ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

d) un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquences SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19, ou un fragment ou un variant de ce dernier.

Par « vecteur » au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

Selon un mode de réalisation, le vecteur d'expression comprend, outre un acide nucléique conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en diriger la transcription et/ou la traduction.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

(1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;

(2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et

(3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de réplication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, des marqueurs ou des marqueurs de sélection.

A titre d'exemples, les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.) ou encore aux techniques décrites par FULLER et al. (1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al).

Les vecteurs préférés selon l'invention sont des plasmides, tels que par exemple les vecteurs pCDNA3 (Invitrogen), pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs de type *baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (PharMingen) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivées de *Spodoptera frugiperda*.

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par FLOTTE et al. (1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7 : 349-356

La présente invention a en outre pour objets des cellules comprenant une protéine, un acide nucléique ou un vecteur tels que décrits ci dessus, ou des fragments de ces cellules, des lysats de ces cellules ou encore des membranes de ces cellules.

De telles cellules peuvent être cellules isolées d'un organisme et cultivées dans un milieu de croissance adéquat. Elles sont néanmoins préférentiellement des lignées cellulaires. Ainsi de telles lignées sont de manière particulièrement avantageuse les lignées cellulaires HEK 293, COS (ATCC N°CRL 1650), COS-M6 et HeLa (ATCC N°CCL2), ou encore Cv 1 (ATCC N°CCL70), Sf-9 (ATCC N°CRL 1711), CHO (ATCC N°CCL-61) ou 3T3 (ATCC N°CRL-6361).

Les membranes de ces cellules peuvent être préparées par toute méthode connue de l'homme du métier.

Préférentiellement elles seront préparées par broyage mécanique des cellules puis centrifugation des suspensions obtenues, comme illustré dans les exemples qui suivent.

La présente invention est en outre relative à des compositions comprenant des cellules telles que décrites ci dessus et de la saponine.

La présente invention est en outre relative à un procédé de détermination de la modification de l'interaction entre la OB-RGRP, la protéine MY047, ou une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

-à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

De manière préférentielle, ledit composé est mis en contact avec une protéine de fusion donneur d'énergie, et une protéine de fusion accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat

Préférentiellement ledit procédé est mis en œuvre avec des cellules traitées par un agent perméabilisant les cellules tel que la saponine.

Les protéines de fusion donneur d'énergie et les protéines de fusion accepteur d'énergie sont choisies de manière à ce que l'énergie résultant de l'activation du donneur puisse être transférée de manière efficace à l'accepteur.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion avec la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, auquel cas le substrat est avantageusement la coelenterazine.

Dans un mode de mise en œuvre préférentiel dudit procédé, la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion avec la YFP ou une partie substantielle de la YFP.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.

Dans un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester et de la leptine (ou un ligand du récepteur), est comparé à celui mesuré en présence du composé en absence de leptine (ou un ligand du récepteur).

Préférentiellement le procédé est mis en œuvre sur des membranes des cellules, telles que décrites ci dessus.

De manière préférentielle les protéines donneur et accepteur selon la présente

invention sont choisies afin que le transfert d'énergie se fasse par BRET (pour Bioluminescence Resonance Energy Transfer ou ou transfert d'énergie de bioluminescence par résonance) de première ou deuxième génération, ou LRET (pour Luminescence Resonance Energy Transfer ou ou transfert d'énergie de luminescence par résonance). Néanmoins un tel transfert d'énergie peut être effectué par FRET (pour Fluorescence Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de fluorescence par résonance) ou encore par CRET (pour Chemioluminescence Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de chimioluminescence par résonance).

Quelque soit le type de transfert d'énergie les couples protéine de fusion donneur/ protéine de fusion accepteur d'énergie sont choisis afin de permettre un tel transfert.

Le BRET2 (2ème génération) consiste en un transfert d'énergie entre la luciférase de *Rénilla*, et une GFP mutante, la GFP₁₀, utilisant un substrat adéquate, la coelantérazine DeepblueCTM (Biosignal Packard).

Le CRET consiste en un transfert d'énergie entre l'aequorine, qui est une luciférase, et la GFP.

Le FRET consiste en un transfert d'énergie entre deux protéines de la famille des GFP ayant des spectres différents.

Pour la mise en œuvre de ces transferts l'homme du métier peut se référer à Ramsay D et al. (Biochem J 365: 429-40 (2002)) et à Yoshioka K et al. (FEBS Lett 523: 147-151 (2002)) pour le BRET2, à Baubet et al. (PNAS USA 97 : 7260-7265 (2000)) pour le CRET, à Matyus (J Photochem Photobiol B 12: 323-337 (1992)) et Pollok et Heim (Trends Cell Biol 9:57-60 (1999)) pour le FRET.

Un autre objet de la présente invention est un procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

-à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

Préférentiellement la protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16 est la OB-RGRP ou MY047.

Le procédé selon la présente invention est compatible avec les plaques à 96 ou 384 puits généralement utilisées. Il ne nécessite pas l'utilisation de molécules radioactives, est sensible, reproductible, rapide et le résultat est facile à lire. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour la mise en oeuvre de criblage à grande échelle.

La présente invention est en outre relative à l'utilisation de composés sélectionnés par un procédé consistant à :

- mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
- à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

Elle a enfin pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine ou à son récepteur comprenant les étapes de:

-sélection dudit composé par un procédé consistant à :

- +mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
- +à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine
- d'administration dudit composé à un patient atteint par la dite maladie.

Des pathologies liées à la leptine peuvent être des maladies liées à une diminution de la densité osseuse comme par exemple l'ostéoporose ou à l'inverse celles liées à une calcification importante.

Elles peuvent aussi être des maladies ayant un effet sur le poids, telles que l'obésité, le diabète ou l'anorexie.

Elles peuvent aussi être des maladies ayant un effet sur la maturation sexuelle l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la formation de thrombus, la régulation de l'immunité et de l'inflammation, le développement fœtal et le cancer.

Les composés de l'invention, oligonucléotides, ARNi, ou autres composés, peuvent être formulés dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

La formulation de compositions thérapeutiques et leur administration est dans les compétences de l'homme du métier.

La formulation des composés peut inclure différents produits connus de l'homme du métier. Préférentiellement, les composés peuvent être par exemple additionnés

- de sels, comme le sodium, le potassium, l'ammonium, le magnésium, le calcium, les polyamines, l'acide hydrochlorique, hydrobromique, sulfurique, phosphorique, ou nitrique. D'autres sels sont également utilisables, comme ceux provenant de l'acide acétique, oxalique, tartrique, succinique, maléique, fumarique, gluconique, citrique, malique, ascorbique, benzoïque, tannique, palmitique, alginique, polyglutamique, naphthalènesulfonique, methanesulfonique, p-toluenesulfonique, naphthalènedisulfonique, polygalacturonique. Enfin, on peut aussi préférentiellement utiliser des sels de chlore, brome et iode.
- 10 La composition et la formulation pour l'administration topique peuvent inclure des patchs transdermiques, des pommades, des lotions, des crèmes, des gels, des gouttes, des suppositoires, des sprays, des liquides et des poudres.
- 15 La composition et la formulation pour l'administration orale peuvent inclure des poudres, des granules, des microparticules, des nano particules, des suspensions, des solutions aqueuses ou non, des capsules, des capsules de gel, des sachets, des tablettes ou mini tablettes. Des épaississants, des arômes, des diluants, des émulsifiants, des aides à la dispersion ou des liants peuvent être ajoutés.
- 20 La composition et la formulation pour l'administration parentérale, intrathécale ou intra ventriculaire, peut inclure des solutions aqueuses stériles qui peuvent aussi contenir des tampons, des diluants et autres additifs comme, mais non limité à des agents augmentant la pénétration, des produits transporteurs et des excipients.
- 25 La composition peut-être formulée et utilisée comme une mousse, une émulsion, une microémulsion, des liposomes cationique, sensibles au pH ou négativement chargés, et des transféromes.
- 30 D'une façon générale, les différentes formulations peuvent contenir un mélange d'un ou plusieurs agents, comme mais non limité à des agents augmentant la pénétration du composé (surfactants, sels biliaires, agents chélateurs, surfactant non chélateurs), des excipients (liants, remplisseurs, lubrifiants, désintégrants, agents mouillant), des transporteurs (eau, solutions salines, alcools, polyéthylène glycol, gélatine, lactose, amylose, stéarate de magnésium, talc, acide silicique, paraffine visqueuse, hydroxyméthylcellulose, polyvinylpyrrolidone). D'autres
- 35 composants peuvent être ajoutés, comme des colorants, des arômes, des conservateurs, des antioxydants, des opacifiants, des agents épaississeurs et des stabilisateurs.
- 40 Le dosage est dépendant de la sévérité et de la sensibilité de l'état de la maladie à traiter, avec une durée de traitement pouvant aller de quelques jours à quelques mois, ou jusqu'à ce que la cure soit efficace ou qu'une diminution de la maladie soit observée. Le dosage optimal peut être calculé à partir de mesures d'accumulation de l'agent thérapeutique dans le corps du patient. L'homme du
- 45 métier peut facilement déterminer les dosages optimum, les méthodes de dosage et les taux de répétitions de ces dosages. Les dosages optimum peuvent varier en fonction de l'efficacité relative de chaque oligonucléotide ou ARNi, et peuvent en général être estimés par la mesure des EC50 des doses utilisées in vitro et in vivo dans des modèles animaux. En général, le dosage est compris entre 0,01µg et

100 g par kilo du poids corporel et peut être administré une fois ou plus, de façon journalière, hebdomadaire, mensuelle ou annuelle, ou même une fois toutes les 2 à 20 années.

Des personnes compétentes peuvent facilement déterminer le taux de répétition des dosages basé sur le temps de présence du composé dans les fluides corporels ou les tissus. Suite à un traitement réussi, il peut être désirable que le patient continue une thérapie de maintenance pour prévenir la réapparition de la maladie, pour ce faire l'oligonucléotide ou l'ARNi sont administrés à des doses de maintenance allant de 0,01 µg à 100 g par kilo du poids corporel, une fois ou plus par jour jusqu'à une fois tous les 20 ans.

L'administration d'antisens in vivo a été réalisée avec succès par divers auteurs, utilisant des protocoles d'injection simple d'antisens par voie intraveineuse (He et al. (1998) *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 12:1-4) ou intracérébrale (Yoburn et al. (2003) *Synapse* 47: 109-116, Tischkau et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 718-723). Ces deux dernières années, des systèmes plus complexes permettant le ciblage d'antisens dans l'organisme ont été développés et utilisés avec succès (Morishita et al. (2002) *J. Endocrinol.* 175: 475-485, Bartsch et al. (2002) *Pharm. Res.* 19: 676-680), permettant chez la souris et le rat, de traiter divers cancers (Rait et al. (2002) *Mol. Med.* 8: 475-486, Ochietti et al. (2002) *J. Drug. Target* 10: 113-121, Eder et al. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9:117-125). La transfection des antisens met en jeu les mêmes procédés que pour la transfection des ARNi, laissant envisager les mêmes applications in vivo pour les ARNi. Dans cette optique, nous pouvons imaginer un ciblage de l'antisens ou des ARNi au niveau du système nerveux central, pour traiter des troubles dont l'origine est centrale (obésité), mais aussi ceux obtenus par une action périphérique des récepteurs de la leptine. Plus particulièrement, une action des antisens ou des ARNi au niveau du transport de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique et impliquant les OB-R peut être envisagée. D'ailleurs, les cellules endothéliales ont déjà été ciblées avec succès par une stratégie antisens in vivo (Bartsch et al. (2002) *Pharm. Res.* 19: 676-680).

Figures :

Figure 1

Séquences des différents ODN antisens utilisés :

Figure 2

Alignement des séquences protéiques d'OB-RGRP de différentes espèces et de la séquence protéique humaine de MY047. Les domaines transmembranaires potentiels ont été déterminés par différentes méthodes (HMMTOP, TMHMM, TopPred2, TMpred) et sont écrites en gras.

Figure 3

Topologie d'OB-RGRP étudiée par BRET, par l'utilisation de la double protéine de fusion YFP-OB-RGRP-Luc. Figure 3a: représentation schématique de la topologie d'OB-RGRP pour le modèles 3 et 4TM. Figure 3b : Résultats des expériences de BRET utilisant les protéines indiquées. Les données sont exprimées en mBU.

Figure 4

Etude de l'oligomérisation d'OB-RGRP par des expériences de SDS-PAGE et immunoprécipitations. Figure 4a: Les cellules exprimant les protéines de fusion indiquées ont été traitées ou non avec du Dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP) 2 mmol.L⁻¹ dans du PBS (1X pH7,4) pour cross-linker les complexes protéiques. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les protéines de fusions avec la YFP ont été détectées par l'utilisation d'un anticorps spécifique anti-YFP. Figure 4b: Les cellules exprimant la construction 6Myc-OB-RGRP ont été solubilisées avec 1% de digitonine ou 5% de SDS et le solubilisé a été immunoprécipité avec un anticorps anti-myc. Les précipitats ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE et les protéines étiquetées avec myc ont été détectées avec un anticorps anti-myc.

Figure 5

Identification des déterminants moléculaires impliqués dans l'oligomérisation d'OB-RGRP. Les protéines de fusions avec les troncations d'OB-RGRP ont été traitées comme décrit Fig. 4b. TM, domaine transmembranaire.

Figure 6

Etude de l'oligomérisation d'OB-RGRP dans les cellules HEK vivantes par la technologie de BRET. Figure 6a: Les protéines de fusion indiquées ont été co-exprimées à un rapport équimolaire, et des expériences de mesures de BRET ont été réalisées. Figure 6b: Des quantités constantes du plasmide OB-RGRP-Luc ont été co-exprimées avec des quantités croissantes du plasmide d'OB-RGRP-YFP et des mesures de BRET ont été réalisées. MT2R-Luc, protéine de fusion du récepteur MT2 de la mélatonine avec la luciférase.

Figure 7

Interaction d'OB-R_s et d'OB-RGRP étudiées par BRET. Les protéines de fusions indiquées ont été co-exprimées à un rapport équimolaire et des mesures de BRET ont été réalisées. IR-YFP, protéine de fusion du récepteur de l'insuline avec la YFP.

Figure 8

Activation dose dépendante des gènes rapporteurs pour STAT3 (Figure 8a) et STAT5 (Figure 8b) dans des cellules HeLa, par OB-R_l en présence d'une sur-expression des constructions de la protéine OB-RGRP comme indiquées.

Figure 9

Effet de la surexpression d'OB-RGRP sur l'expression des OB-R à la surface des cellules. Des cellules HEK 293 transfectées ou non avec le vecteur d'expression d'OB-RGRP, et des cellules COS transfectées avec les vecteurs d'expression d'OB-R_l ou OB-R_s et +/- les vecteurs d'OB-RGRP, ont été utilisées pour déterminer la quantité de récepteurs exprimés à la surface et le total exprimé dans les cellules par des expériences de liaison de ¹²⁵I-leptine.

Figure 10

Effet des différents oligodésoxynucléotides (ODN) antisens sur le niveau des messagers d'OB-RGRP observés par RT-PCR semi-quantitative. Figure 10a: détermination de la zone linéaire d'amplification des transcrits d'OB-RGRP et de la GAPDH, en fonction du nombre de cycles PCR. Figure 10b: quantification des résultats montrés dans le panneau a. Figure 10c: Détermination des niveaux

d'expression relatifs des ARNm d'OB-RGRP à 26 cycles PCR, dans les cellules incubées avec les différents ODN antisens.

Figure 11

Effet des ODN antisens spécifiques d'OB-RGRP sur l'activation d'un gène rapporteur STAT3. Les cellules HeLa ont été co-transfectées premièrement avec le vecteur d'expression OB-R_I et les constructions des gènes rapporteurs pour STAT3 ou 5, puis avec les ODN antisens indiqués. Après 48 heures de stimulation ou non avec 10 nmol.L⁻¹ de leptine.

Figure 12

Effet des ODN antisens spécifiques d'OB-RGRP sur l'expression en surface des OB-R. Les cellules HeLa ont été transfectées ou non avec les plasmides d'expression d'OB-R_I ou d'OB-R_S avant une seconde transfection ou non avec les ODN antisens indiqués. 48 h post-transfection, la quantité d'OB-R totale et la fraction exposée à la surface a été déterminée dans des expériences de liaison avec de la ¹²⁵I-leptine.

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent.

20 Matériels et Méthodes utilisés dans les exemples

Construction des plasmides.

Les protéines de fusions des OB-R avec la YFP et la luciférase ont été construites par ligation de la YFP et de la Luciférase à la partie C-terminale des récepteurs d'OB-R, par des techniques standards de biologie moléculaire. La région codante de la YFP a été obtenue à partir du vecteur Cytogem®-Topaze (pGFPTpz-N1) (Packard, Meriden, CT) et fut insérée dans le site EcoRV du vecteur pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Pays-bas) contenant un polylinker modifié. La région codante de la *Renilla* luciférase a été obtenue à partir du vecteur pRL-CMV (Promega, Madison, WI) et insérée dans le site EcoRV du vecteur pcDNA3 modifié. Les régions codantes d'OB-R_I et d'OB-R_S (gift of Dr. Gainsford, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australie) ont été insérée dans les deux vecteurs décrits ci-dessus, respectivement dans les sites EcoR1/BamH1 et Nhe1. Les codons stop ont été supprimés par mutagenèse dirigée et la phase des protéines de fusion a été ajustée en même temps.

Le vecteur pcDNA3-OB-RGRP a été obtenu par insertion de la région codante d'OB-RGRP, obtenue depuis le vecteur pCDNA3-Di1, dans les sites EcoR1 et Xba1 du vecteur pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Pays-bas). Le codon stop d'OB-RGRP a été supprimé par mutagenèse dirigée. Le vecteur pcDNA3-OB-RGRP-Luc a été obtenu par digestion du vecteur pRL-CMV N3 (Promega, Madison, WI) avec Sma1 et Hpa1 et par insertion du fragment, correspondant à la région codante de la *Renilla* luciférase, après la région codante d'OB-RGRP dans le site BspE1 rempli du vecteur pcDNA3-OB-RGRP.

Le vecteur pcDNA3-YFP a été obtenu par sous-clonage de la région codante de la YFP à partir du vecteur pGFPTpz-N1 (Packard, Meriden, CT) inséré dans le site EcoRV du vecteur pcDNA3/CMV. Le vecteur pcDNA3-OB-RGRP-YFP a été obtenu par insertion du fragment BamH1/BspE1 du vecteur pcDNA3-OB-RGRP non-stop dans le vecteur pcDNA3-YFP digéré avec les enzymes BamH1 et Age1.

La construction pcDNA3-GFP-OB-RGRP-Luc a été obtenue par insertion du fragment OB-RGRP-Luc du vecteur pcDNA3-OB-RGRP-Rluc coupé par EcoR1, dans le site EcoR1 du vecteur pcDNA3-YFP. Le codon stop de la YFP a été éliminé par mutagenèse dirigée.

5 Le vecteur 6Myc-OBR-GRP (4TM) a été obtenu par insertion du fragment 6myc du vecteur pCDNA3-RSV-6Myc, dans les sites BamH1 et EcoR1 du vecteur pCDNA3-OBRGRP. Les différentes délétions d'OB-RGRP (2 et 3 TM) ont été obtenus par PCR et insertion dans le vecteur pcDNA3 dans les sites EcoR1 et Xba1. La séquence codante de MY047 a été obtenue par RT-PCR sur des ARNm
10 d'origine humaine. Le fragment PCR a été digéré par les enzymes de restriction EcoR1/Xba1 et inséré dans le vecteur pcDNA3-Topaze coupé par les mêmes enzymes. Le codon stop de la YFP a ensuite été éliminé par mutagenèse dirigée pour obtenir le vecteur pcDNA3-YFP-MY047. Le vecteur pcDNA3-MY047-GFP a été obtenu par insertion du fragment d'ADN obtenu par PCR sur le vecteur
15 pcDNA3-YFP-MY047 et coupé par BamH1, puis inséré dans le vecteur pcDNA3-YFP coupé par la même enzyme. L'insertion du même fragment dans le vecteur pcDNA3-Rluc coupé par BamH1 a permis d'obtenir le vecteur pcDNA3-MY047-Rluc.

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

20 **Culture cellulaire et transfection.**

Les cellules HEK 293, COS-7- et HeLa ont été cultivées dans du DMEM
supplémenté avec 10% (v/v) de SVF, 4,5 g/litre de glucose, 100 U/ml de
pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, 1 mmol.L-1 de glutamine (tous de Life
Technologies, Gaithersburg, MD). Les transfections transitoires ont été réalisées
25 avec le réactif FuGene 6 (Roche, Basel, Suisse) selon les instructions du fournisseur.

Préparation des membranes et solubilisation.

Les membranes ont été préparées comme décrit précédemment (19), et
resuspendues dans du Tris 75 mmol.L-1 (pH 7,4), du MgCl₂ 12,5 mmol.L-1, et
30 EDTA 5 mmol.L-1 et immédiatement utilisées dans des expériences de BRET.

SDS PAGE et Western blot.

Les lysats totaux ont été préparés par lavage des cellules une fois au PBS
froid (pH 7,4) et dénaturés par l'ajout de tampon de dépôt (30mmol.L-1 Tris HCl
35 pH 6,8, 1% glycérol 5% SDS, 50 mmol.L-1 DTT et 0,05% bromophenol blue). Les
lysats totaux ou les immunoprécipités ont été incubés pendant 10 minutes à 90°C
puis déposés sur gel d'acrylamide 10% pour une séparation par électrophorèse
(SDS-PAGE). Les protéines ont alors été transférées sur une membrane de
nitrocellulose et révélées par des anticorps primaires spécifiques : anti-YFP (8367-
40 1 Living Colors) au 1/200ème, anti-myc A14 (sc-789 TEBU Peptidech Santa Cruz
Biotechnology) au 1/500ème, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase
(IgG de chèvre anti-lapin ; Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West
Baltimore Pike) au 1/10000ème. Les bandes immuno-réactives ont été révélées
par un kit ECL (Pharmacia Biotech).

Immunoprecipitation.

Deux jours après la transfection, les cellules ont été lavées une fois au PBS froid, et les protéines ont été extraites par une incubation pendant 15 minutes dans du tampon de lyse (PBS 1X, Nonidet P40 1%, Sodium Desoxycholate 0,5%, SDS 0,1%, NaN₃ 0,02%, benzamidine 10 mg.L⁻¹ et des inhibiteurs de trypsine 5 mg.L⁻¹). Le lysat a été centrifugé à 18000 g pendant 15 min et le surnageant a ensuite été incubé pendant 3 heures à 4°C avec un anticorps anti-myc couplé à des billes d'agarose (sc-40AC TEBU preprotech, Santa CRUZ Biotechnology). Les précipités ont été lavés trois fois avec du tampon de lyse froid puis dénaturés avec du tampon de dépôt pour SDS-PAGE.

Expériences de radioliation.

Les expériences de radioliation ont été réalisées comme décrit précédemment (Barr et al.), avec de légères modifications. Pour déterminer la liaison de la leptine en surface, les cellules cultivées en plaques 6 puits ont été lavées deux fois au PBS froid et incubées dans le tampon de liaison (DMEM, 25 mmol.L⁻¹ Hepes pH 7,4, 1% BSA) contenant 100000 cpm/puit de ¹²⁵I-leptin (PerkinElmer life sciences, Paris, France) en présence ou non de 200 nmol.L⁻¹ de leptine (PeproTech Inc, USA) pendant 4 h à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois au PBS froid, puis lysées dans du NaOH 1N, et la radioactivité a été déterminée dans un compteur γ . Pour déterminer la liaison totale de la leptine, les cellules cultivées dans des boîtes de 10 cm de diamètre ont été solubilisées dans 1,5 ml de tampon de liaison contenant 0,15% de digitonine pendant 2 h à 4°C. Les extraits ont été centrifugés 30 min à vitesse maximale et à 4°C. Les surnageants (0,2ml) ont été incubés avec 100000 cpm de ¹²⁵I-leptine en présence ou non de 200 nmol.L⁻¹ de leptine, dans un volume total de 0,25 ml en rotation constante à 4°C pendant une nuit. 0,5 ml de γ -globuline (1,25 mg/ml) et 0,5 ml de polyéthylène glycol 6000 (25% p/v) ont été ajoutés pour précipiter les complexes récepteurs-ligands, qui ont été centrifugés à 17000 g pendant 3 min. Le culot a été lavé une fois avec 1ml de polyéthylène glycol 6000 (12 % p/v) et la radioactivité a été déterminée dans un compteur γ .

Test d'activation des gènes rapporteurs.

Les cellules HeLa cultivées dans des puits de plaques 6 puits ont été co-transfectées avec 500 ng d'un plasmide rapporteur exprimant la luciférase de *firefly* sous le contrôle d'éléments de réponse pour les facteurs STAT3 ou STAT5, (gift of Dr. Levy, Université de New York, New York, USA), 250 pg du vecteur d'expression pcDNA3-luciférase de *Renilla* (utilisé comme standard interne entre les échantillons) et avec 500 ng des différents vecteurs d'expression des OB-R ou le vecteur seul. 48 h après la transfection, les cellules ont été mises à jeun pendant une nuit dans du milieu Otpimem (Invitrogen, Groningen, Pays-bas) contenant 1% de BSA, avant stimulation ou non par 10 nmol.L⁻¹ de leptine pendant 48 h. Les cellules ont alors été lavées une fois au PBS puis lysées dans du tampon de lyse passif (Promega Corporation, Madison, WI) pendant 15 min à température ambiante. Les lysats totaux ont été centrifugés pendant 2 min à 15000 g et les surnageants ont été utilisés dans un test de mesure de luciférase (Dual Luciferase Assay System de Promega Corporation, Madison, WI) en

utilisant un luminomètre Berthold (Lumat LB 9507). Les résultats sont exprimés en rapport des activités de la luciférase de *firefly* sur la luciférase de *Renilla*.

Mesures de BRET en microplaques.

48 h après transfection, les cellules COS-7, HeLa ou HEK 293 exprimant les protéines de fusions des OB-R ont été détachées et lavées dans du PBS. 1-2x10⁵ cellules ont été distribuées dans des puits de plaques optiplate (96 puits, Packard Instrument Company, Meriden, CT) en présence ou non des ligands et incubées à 25 °C. De façon alternative, nous avons procédé de la même façon avec des membranes préparées à partir des cellules exprimant les différentes constructions. Le substrat, la Coelenterazine h (Molecular Probes, Eugene, OR) a été ajouté à une concentration finale de 5 µmol.L⁻¹ et les lectures ont été réalisées avec un lumino/fluorimètre FusionTM (Packard Instrument Company, Meriden, CT) qui permet la mesure de la luminescence à travers deux filtres (filtre Luciférase: 485 ± 10 nm; filtre YFP: 530 ± 12.5 nm). Le rapport de BRET a été défini comme la différence d'émission à 530 nm/485 nm des cellules co-transfectées avec les protéines de fusion Luc et YFP et l'émission à 530 nm/485 nm de la protéine de fusion Luc transfectée seule dans les cellules. Les résultats sont exprimés en unités de milliBRET (mBU), 1 mBRET correspond aux valeurs des différences des ratios multipliées par 1000.

RT-PCR.

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski P., et Sacchi N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159). 1 µg d'ARN est dénaturé pendant 5 minutes à 68°C puis refroidit brutalement pendant 5 min à 4°C. L'échantillon dénaturé est reverse-transcrit pendant 1 h à 37°C dans 20 µl de milieu réactionnel RT (5µmol.L⁻¹ PdN6, 10µmol.L⁻¹ DTT, 50mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH=8,3, 75mmol.L⁻¹ KCl, 5mmol.L⁻¹ MgCl₂, 500 µmol.L⁻¹ dNTP, 200U RT-MMLV). Un aliquote de 2,5 µl de cette réaction est utilisé pour une réaction de PCR dans un volume final de 25µl (40mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,4; 100 mmol.L⁻¹ KCl; 1,5 mmol.L⁻¹ MgCl₂; 0,2mmol.L⁻¹ de chaque dNTP; 0,141mmol.L⁻¹ d'amorces spécifiques d'OB-RGRP (Sens: CCGTGGCAGGAAGC, antisens: CAGCCACACGAGCAAG) et 0,035mmol.L⁻¹ d'amorces spécifiques de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) (sens: GGAGAAGGCTGGGGC, antisens: GATGGCATGGACTGTGG) et 2,5U de TAQ DNA polymérase). Le protocole suivant a été utilisé pour la réaction de PCR : Dénaturation initiale de 3 min à 94°C, puis 22 à 30 cycles de dénaturation (20 sec à 94°C), hybridation (20 sec à 59°C), élongation (20 sec à 72°C) suivie par une élongation finale de 7 min à 72°C.

Un aliquote de la réaction de PCR est déposé sur un gel d'agarose à 2% pour séparer les produits de la réaction par électrophorèse. Les tailles attendues des fragments de la GAPDH et d'OBR-GRP sont respectivement de 229 pb et 334 pb.

Synthèse d'oligonucléotides

- Les oligonucléotides ont été synthétisés sur synthétiseur automatique d'ADN (modèle 8909 "Expedite MOSS" d'Applied Biosystems) par chimie standard de phosphoramidites et oxydation à l'iode. La déméthylation a été effectuée par une solution à 0,2 mol.L⁻¹ de 3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxyde dans l'acétonitrile pendant 120 s. Le détachement du support et la déprotection ont été réalisés en ammoniac concentré (18 h à 55°C), puis les oligonucléotides ont été purifiés par précipitation. Le produit de déprotection a été précipité par 10 volumes de 1-butanol; le culot repris dans un volume de NaCl à 0,3 mol.L⁻¹ a été reprecipité par l'addition de 4 volumes d'éthanol.
- 10 L'analyse par gel de polyacrylamide à 20% (en tampon urée 8 mol.L⁻¹ et Tris-borate 454 mmol.L⁻¹ à pH 7,0) a montré une proportion supérieure à 80% de produit de longueur attendue.

Transfection des OligoDesoxyNucleotides antisens.

- Pour la transfection de 300 000 cellules cultivées dans un puit de plaque 6 puits, 10 µL d'ODN antisens à 20 µmol.L⁻¹ ont été dilués dans 175 µL de DMEM. 3 µL d'oligofectamine (Invitrogen, Groningen, Pays-bas) et 12 µL de DMEM ont été incubés dans un second tube pendant 10 min à température ambiante. Le mélange oligofectamine / DMEM est alors ajouté à l'ODN antisens dilué, vortexé et incubé 20 min à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules sont lavées une fois au PBS, une fois au DMEM, puis recouvertes de 800 µl de DMEM. Le mélange ODN / oligofectamine a alors été ajouté goutte à goutte sur les cellules et incubé 4h à 37°C avant l'ajout de 500 µl de DMEM supplémenté avec 30% de sérum.

Exemple 1 : Topologie et localisation cellulaire d'OB-RGRP.

- 25 Pour étudier la topologie et la localisation subcellulaire d'OB-RGRP, nous avons étiqueté la protéine avec le variant jaune de la Green Fluorescent Protéine (YFP) à l'extrémité de sa queue C-terminale. La protéine de fusion a été exprimée dans les cellules HeLa et sa localisation a été déterminée par microscopie de fluorescence.
- 30 Les résultats montrent que la protéine de fusion est ciblée préférentiellement au niveau des membranes périnucléaires et dans des vésicules intracellulaires. Des résultats similaires ont été observés dans les cellules HEK. Aucune co-localisation avec des protéines cytoplasmique et nucléaires n'ont été observées, confirmant la localisation d'OB-RGRP au niveau de membranes (non montré). La nature exacte du compartiment membranaire a été déterminé par des études de co-localisation avec des marqueurs spécifiques de compartiment subcellulaires. Une forte co-localisation a été observée avec la chaîne invariante des protéines de classe II du CMH, un marqueur du compartiment endocytiq.
- 35 L'analyse initiale de la topologie d'OB-RGRP suggérait une organisation en 3 domaines transmembranaires (TM) (14). Une organisation similaire a été proposée pour MY047 (16). Cependant, une nouvelle analyse du profil d'hydrophobicité des différentes séquences protéiques disponibles pour OB-RGRP et MY047 est aussi compatible avec un modèle à 4 TM (Fig. 2). La topologie diffère profondément entre ces deux modèles. Dans le modèle à 3 TM, les extrémités N- et C-terminales sont localisées de chaque côté de la membrane,
- 40
- 45

alors que dans le modèle à 4 TM, les deux queues sont orientées du même côté de la membrane (Fig. 3a). Pour déterminer le bon modèle, nous avons utilisé la méthode de transfert d'énergie par résonance (BRET), qui a récemment été développée pour suivre les interactions protéine-protéine dans les cellules vivantes (Xu et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A 96, 151-156). Dans le cas d'une proximité physique ($< 100 \text{ \AA}$) entre les deux protéines interagissant, un transfert d'énergie peut avoir lieu entre le donneur d'énergie (Luc) et l'accepteur d'énergie (YFP), fusionnés aux deux protéines d'intérêt. Nous avons étiqueté la queue N-terminale d'OB-RGRP avec la YFP, la queue C-terminale avec la luciférase, et nous avons observé le transfert d'énergie par des mesures de BRET avec cette double protéine de fusion. Le modèle à 3 TM ne permet pas de transfert puisque les deux partenaires de BRET sont séparés par la bicouche lipidique. Le modèle à 4 TM au contraire prévoit un fort transfert d'énergie puisque les deux partenaires sont localisés du même côté de la membrane. Comme montré dans la figure 3b, un très fort transfert d'énergie a été détecté pour la double protéine de fusion dans les cellules intactes, indiquant qu'OB-RGRP possède 4 TM.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'OB-RGRP est une protéine membranaire à 4 domaines transmembranaires, possédant 3 courtes boucles et des extrémités N- et C-terminales courtes orientées du même côté de la membrane. OB-RGRP est majoritairement localisée dans des compartiments intracellulaires.

Exemple 2: Oligomérisation d'OB-RGRP.

L'oligomérisation est une propriété commune à différentes protéines y compris des protéines membranaires comme les récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs aux cytokines et les phosphotyrosines phosphatase. Il a été montré que cette oligomérisation joue un rôle important dans la fonction de ces protéines. Pour obtenir des éléments dans la fonction d'OB-RGRP, nous avons voulu savoir si cette protéine oligomérisait.

OB-RGRP a été étiquetée avec la YFP à sa queue C-terminale et exprimée dans des cellules HeLa. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (PAGE-SDS) et des expériences d'immunoblot ont été réalisées avec un anticorps anti-YFP. La figure 4a révèle plusieurs bandes spécifiques d'OB-RGRP-YFP, correspondant à des formes monomériques, dimériques et des complexes oligomériques. Des résultats similaires ont été obtenus avec OB-RGRP étiquetée en N-terminal soit avec la YFP ou un épitope myc (Fig. 4 a,b). La formation des oligomères d'OB-RGRP a été observée sur des extraits cellulaires totaux après immunoprécipitation. L'utilisation d'un cross-linker sur les cellules entières, stabilise les complexes dimériques, indiquant que la forme dimérique est la forme prédominante d'OB-RGRP dans les cellules intactes (Fig. 4a).

De façon surprenante, OB-RGRP a des propriétés inattendues puisque les oligomères sont stables en présence de différents agents dénaturant et/ou dissociant comme le SDS 5%, le Triton X-100 1%, le Nonidet P40 1%, la digitonine 1%, le DTT 50 mmol.L^{-1} et le β -mercaptoéthanol 2%. Cependant, des observations similaires ont été obtenues pour d'autres protéines membranaires comme la glycophorine A et les récepteurs β 2-adrenergiques couplés aux

protéines G. Des études sur ces protéines montrent respectivement que des motifs **LIXXGVXXG** et **LXXXGXXXGXXXL** dans les domaines transmembranaires sont essentiels pour la formation des oligomères. Des motifs similaires ont été identifiés dans les régions membranaires d'OB-RGRP.

5 Pour identifier les déterminants moléculaires impliqués dans la dimérisation, nous avons réalisé des constructions d'OB-RGRP présentant des délétions progressives de la queue C-terminale (Fig. 5). Une construction contenant les deux premiers TM potentiels perd la capacité de former des oligomères. L'addition du 3^{ème} TM restaure la possibilité de former des dimères. Cependant, le profil
10 complet d'oligomérisation a seulement été observé en présence des 4 TM potentiels.

Les oligomères de protéines membranaires peuvent être des artefacts induits durant la préparation des échantillons (solubilisation, dénaturation etc.). C'est pourquoi il est important de vérifier l'oligomérisation des protéines dans des
15 cellules vivantes. Les techniques de transfert d'énergie développées récemment comme le BRET permettent de suivre de telles interactions protéines-protéines dans les cellules vivantes. Des protéines de fusions d'OB-RGRP avec la luciférase et la YFP ont été utilisées pour suivre l'oligomérisation d'OB-RGRP dans les cellules vivantes. La co-expression des constructions OB-RGRP-YFP ou YFP-OB-
20 RGRP avec la construction OB-RGRP-Luc induit un transfert d'énergie (Fig. 6a). La spécificité de cette interaction a été montrée par l'absence de transfert d'énergie lors de la co-expression avec deux protéines de fusions différentes : la β arrestine2-YFP (Angers et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3684-3689), ou le récepteur MT2 de la mélatonine-Luc (Ayoub et al. (2002) J Biol Chem 277, 21522-21528). Nous avons alors exprimés différents rapports des partenaires de
25 BRET (Fig. 6b). Le signal de BRET est augmenté de façon hyperbolique en fonction du ratio OB-RGRP-YFP / OB-RGRP-Luc, atteignant une asymptote qui correspond à la saturation des molécules donneurs d'énergie (OB-RGRP-Luc) par les molécules accepteurs (OB-RGRP-YFP), ce qui est attendu dans le cas d'une
30 interaction spécifique.

Collectivement, ces résultats montrent qu'OB-RGRP est une protéine membranaire dimérique qui peut aussi être engagée dans des complexes oligomériques de plus haut poids moléculaire. Les 3^{ème} et 4^{ème} domaines transmembranaires potentiels semblent être importants pour la formation des
35 oligomères.

Exemple 3: Interaction entre les OB-R et OB-RGRP.

Nous avons utilisé la technologie de BRET pour étudier une possible interaction entre les OB-R et OB-RGRP dans les cellules vivantes. Un transfert
40 d'énergie a été observé de façon constitutive dans les cellules co-exprimant la construction OB-R_s-Luc et la construction OB-RGRP-YFP indiquant une proximité des partenaires d'interaction (Fig. 7). Les mêmes résultats ont été obtenus dans des cellules co-exprimant OB-R_s-Luc et la construction MYO47-YFP, ainsi que dans l'orientation inverse : dans des cellules co-exprimant OB-RGRP-Luc et OB-
45 R_s-YFP, ou dans des cellules co-exprimant MYO47-Luc et OB-R_s-YFP. La spécificité de ces interactions a été confirmée par l'absence de transfert d'énergie entre OB-R_s-Luc, OB-RGRP-Luc, MYO47-Luc et une construction du récepteur de l'insuline étiqueté avec la YFP (Boute et al. (2001) Mol Pharmacol 60, 640-645),

ainsi que dans l'orientation inverse : par l'absence de transfert d'énergie entre une construction du récepteur de l'insuline étiqueté avec la Luc et les constructions OB-R_s-YFP, OB-RGRP-YFP et MYO47-YFP. La co-expression d'OB-R_s-Luc et une construction d'OB-RGRP ou de MYO47 présentant l'étiquette YFP en N-terminal ne provoque pas de signal significatif, confirmant la spécificité de l'interaction avec OB-RGRP-YFP et MYO47 et indique que l'extrémité N-terminale d'OB-RGRP et MYO47 doit être impliquée dans l'interaction avec OB-R.

Aucun transfert d'énergie significatif n'a été observé dans les cellules co-exprimant les constructions OB-R_i-Luc et OB-RGRP-YFP ou YFP-OB-RGRP. Ceci

n'est pas du à une absence d'expression fonctionnelle OB-R_i-Luc puisqu'un signal de BRET spécifique a été observé dans des cellules co-exprimant OB-R_i-YFP pour suivre la dimérisation des OB-R. L'absence de BRET entre les protéines de fusions OB-R_i-Luc et OB-RGRP-YFP n'exclue pas une interaction directe entre ces deux protéines puisque cela peut être expliqué par le fait que la distance entre les deux partenaires de BRET (Luc et YFP) soit plus importante que 100 Å, la distance maximale permettant d'obtenir un transfert. Cela doit être le cas puisque les extrémités N- et C-terminales d'OB-RGRP doivent être localisées proche de la région transmembranaire des OB-R, alors que l'extrémité C-terminale d'OB-R_i doit plus probablement pointer vers le cytoplasme à cause de sa longue queue intracellulaire d'environ 300 acides aminés. Etant donné que les isoformes courte et longue des OB-R partagent les mêmes régions trans- et juxta-membranaire et que l'interaction d'OB-RGRP avec OB-R_s est localisée à ce niveau, il est probable qu'OB-RGRP interagisse avec OB-R_i de la même manière qu'avec OB-R_s.

Exemple 4: Effet de la surexpression d'OB-RGRP sur la signalisation des OB-R.

Des constructions contenant des éléments de réponse pour STAT3- ou STAT5-en amont d'un gène reporter luciférase ont été co-exprimées avec OB-R_i en absence ou en présence de différentes constructions d'OB-RGRP (Fig. 8). Les deux constructions ont été activées par la leptine de façon dose dépendante avec un EC50 d'environ 50 pM. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules HEK 293 exprimant de façon stable un gène rapporteur pour STAT3. La surexpression de différentes constructions d'OB-RGRP n'a pas eu d'effet reproductible sur cette activation indiquant qu'OB-RGRP n'est pas un facteur limitant.

Exemple 5: Effet de la surexpression d'OB-RGRP sur l'expression des OB-R à la surface.

Dans des levures knock-out pour OB-RGRP (Vps55), le transport de protéines est perturbé entre le golgi et les vacuoles (Belgareh-Touze et al. (2002) Molecular Biology Of The Cell 13, 1694-1708) . Bien que les OB-R soit activés uniquement lorsqu'ils sont exprimés à la membrane plasmique, une quantité importante de récepteurs est accumulée dans des compartiments intracellulaires (Barr, et al. (1999) J Biol Chem, 274, 21416-21424)(Lundin et al. (2000)

Biochimica et Biophysica Acta 1499, 130-138) . C'est pourquoi nous avons testé les effets de la surexpression d'OB-RGRP sur l'expression des OB-R à la surface des cellules.

La répartition des récepteurs a été étudiée par des expériences de liaison de ¹²⁵I-leptine. En accord avec d'autres auteurs (Barr et al. 1999), nous avons montré que seulement 10 – 20 % des récepteurs OB-R_i et OB-R_s sont exprimés à la surface de cellules COS transfectées (Fig. 9) et des cellules HeLa. Ce n'est pas un artéfact due à l'expression de récepteurs exogènes car des valeurs similaires sont obtenues dans des cellules HEK 293 exprimant des récepteurs endogènes OB-R (Fig. 9). La surexpression d'OB-RGRP n'a pas montré de modification de la quantité totale dans les cellules, et le % de récepteurs exprimés à la surface (Fig. 9).

Exemple 6: Caractérisation de desoxynucléotides antisens spécifiques d'OB-RGRP

OB-RGRP semble avoir une expression ubiquitaire, c'est pourquoi la diminution de l'expression de cette protéine a été choisie comme approche alternative pour étudier son rôle dans la fonction des OB-R. Quatorze antisens spécifiques pour OB-RGRP (AS 1 à 14) et deux antisens aléatoires (AS 15 et 16) ont été choisis (voir Figure 1), synthétisés puis testés pour leur capacité à inhiber l'expression d'OB-RGRP par des expériences de RT-PCR semi-quantitative dans les cellules HeLa exprimant OB-RGRP de façon endogène (Fig. 10). Seul un de ces antisens (AS-14), dérivé de la région 3' non traduite de l'ARNm d'OB-RGRP interfère avec l'expression d'OB-RGRP. Le marquage de cet antisens avec le fluorophore Cy3 a permis de montrer que l'ensemble des cellules était transfecté avec nos conditions expérimentales, lors de nos différentes expériences.

Exemple 7: Effet de l'antisens spécifique d'OB-RGRP sur la signalisation et l'expression en surface des OB-R.

Les cellules HeLa ont d'abord été co-transfectées avec les vecteurs d'expression d'OB-R_i et le gène rapporteur pour STAT3 puis avec les antisens. La leptine provoque une augmentation de l'activation basale du gène rapporteur pour STAT 3 d'environ 1,5 fois dans les cellules contrôles sans antisens, ou avec un antisens contrôle (AS16) (Fig. 11). Dans les cellules transfectées avec l'antisens spécifique pour OB-RGRP (AS-14), la signalisation basale et stimulée par la leptine est relativement augmentée par rapport aux conditions contrôles. Ceci montre que l'activation de la voie JAK/STAT est augmentée dans les cellules présentant une diminution de l'expression d'OB-RGRP. Ces observations peuvent être expliquées par un effet inhibiteur d'OB-RGRP sur l'activité basale et stimulée des OB-R, et dans ce cas, OB-RGRP peut être considérée comme un régulateur de la signalisation des OB-R. Une autre alternative est qu'OB-RGRP pourrait réguler l'expression des récepteurs en surface en limitant le nombre des OB-R atteignant la surface des cellules. Ceci est en accord avec le fait que seulement 10 à 20 % des récepteurs exprimés atteignent la surface cellulaire. Dans cette hypothèse, la diminution de l'expression d'OB-RGRP devrait augmenter le nombre de récepteurs à la surface des cellules, ce qui devrait augmenter la signalisation

par ces récepteurs. Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié le nombre de récepteurs OB-R_i et OB-R_s exprimés à la surface des cellules en présence (contrôle) et en absence (AS-14) d'OB-RGRP (Fig. 12). La transfection de l'antisens aléatoire n'a pas montré d'effet sur le nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules, alors que celle de l'antisens spécifique (AS-14) a provoqué une augmentation de 3 fois du nombre des OB-R exprimés à la membrane plasmique. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules HeLa non transfectées exprimant des récepteurs endogènes. Dans ces conditions expérimentales, le nombre total de récepteurs, mesuré par des expériences de liaison de ¹²⁵I-leptine, n'a pas montré de variations significatives.

L'ensemble de nos résultats est consistant avec le rôle d'OB-RGRP chez la levure, dans le transport des protéines. L'augmentation de l'expression en surface des OB-R semble impliquée dans l'augmentation de la signalisation observée. Cependant, nous ne pouvons pas totalement exclure l'hypothèse qu'OB-RGRP régule directement l'activité des OB-R. L'application d'antisens spécifiques dirigés contre OB-RGRP devrait être utile pour augmenter la signalisation des OB-R dans les désordres associés à la leptine, comme l'obésité humaine où l'on observe une résistance à la leptine, caractérisée par une réponse inadaptée à cette hormone. L'augmentation de l'expression des récepteurs à la surface des cellules et de leur signalisation doit être importante pour augmenter la réponse à la leptine dans le cas de l'obésité humaine, premièrement par augmentation du transport de la leptine vers le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique et deuxièmement par une augmentation de la signalisation des OB-R au niveau de l'hypothalamus.

L'interaction entre OB-RGRP et OB-R_s laisse supposer que l'action d'OB-RGRP se fait par cette interaction directe avec les récepteurs et qu'empêcher celle-ci peut conduire à reproduire les effets de l'ODN antisens spécifique. Nous proposons d'utiliser le test de BRET des interactions entre OB-RGRP et OB-R_s, et MYO47 et OB-R_s décrit plus haut, comme test de criblage de molécules pouvant moduler cette interaction. Ce test pourra être réalisé soit sur des cellules entières ou perméabilisées, co-exprimant les protéines de fusions des partenaires de BRET d'OB-RGRP et d'OB-R_s ou de MYO47 et d'OB-R_s, soit sur des fractions membranaires issues de ces cellules.

REVENDICATIONS

- 5 1. Oligonucléotide éventuellement modifié comprenant de 8 à 50 nucléotides qui hybride de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 1 et inhibe l'expression de OB-RGRP.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il favorise l'expression des récepteurs de la leptine à la surface cellulaire.
3. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce qu'il est un antisens.
- 15 4. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N° 2.
- 20 5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que des nucléotides sont thioestérifiés.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que des nucléotides sont 2' O-méthylés.
- 25 7. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il présente un résidu triéthylèneglycol à son extrémité 3'.
8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il est simple brin.
- 30 9. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont thioestérifiés.
- 35 10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont 2' O-méthylés.
- 40 11. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il est un ADN.
- 45 12. Oligonucléotide de type ARNi comprenant de 15 à 25 nucléotides caractérisé en ce qu'il hybride de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 21 et inhibe l'expression de OB-RGRP.

REVENDICATIONS

- 5 1. Oligonucléotide éventuellement modifié comprenant de 8 à 50 nucléotides qui hybride de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 1 et inhibe l'expression de OB-RGRP.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il favorise l'expression des récepteurs de la leptine à la surface cellulaire.
3. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce qu'il est un antisens.
- 15 4. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N° 2.
- 20 5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que des nucléotides sont thioestérifiés.
6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que des nucléotides sont 2' O-méthylés.
- 25 7. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il présente un résidu triéthylèneglycol à son extrémité 3'.
8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il est simple brin.
- 30 9. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont thioestérifiés.
- 35 10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont 2' O-méthylés.
- 40 11. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il est un ADN.
- 45 12. Oligonucléotide de type ARNi comprenant de 15 à 25 nucléotides caractérisé en ce qu'il hybride de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 21 et inhibe l'expression de OB-RGRP.
- 50 13. Oligonucléotide selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est un ARN double brin.

13. Oligonucléotide selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est un ARN double brin.
- 5 14. Vecteur exprimant un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 4 et 12.
15. Cellule contenant un vecteur selon l'une des revendications 13 et 14.
- 10 16. Médicament contenant un oligonucléotide, un vecteur ou une cellule selon l'une des revendications 1 à 15.
- 15 17. Composition pharmaceutique contenant une quantité pharmacologiquement active d'un oligonucléotide, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 15 et des excipients pharmaceutiquement acceptables.
- 20 18. Utilisation d'un oligonucléotide, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 15 pour la fabrication d'un médicament pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.
- 25 19. Protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'une séquence présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou avec la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de la séquence SEQ ID N°16, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.
- 30 20. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que la protéine est une luciférase.
- 35 21. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que la protéine est la GFP ou un mutant de cette protéine ou la DsRed.
- 40 22. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que le mutant de la GFP est la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, ou la Topaz.
- 45 23. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°18 ou SEQID N°20.
24. Acide nucléique codant pour l'une des protéines selon l'une des revendications 19 à 23.
25. Acide nucléique selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19.

14. Vecteur exprimant un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 4 et 12.
15. Cellule contenant un vecteur selon la revendication 14.
- 5 16. Médicament contenant un oligonucléotide, un vecteur ou une cellule selon l'une des revendications 1 à 15.
- 10 17. Composition pharmaceutique contenant une quantité pharmacologiquement active d'un oligonucléotide, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 15 et des excipients pharmaceutiquement acceptables.
- 15 18. Utilisation d'un oligonucléotide, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 15 pour la fabrication d'un médicament pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.
- 20 19. Protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'une séquence présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou avec la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de la séquence SEQ ID N°16, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.
- 25 20. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que la protéine est une luciférase.
- 30 21. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que la protéine est la GFP ou un mutant de cette protéine ou la DsRed .
- 35 22. Protéine de fusion selon la revendication 21 caractérisée en ce que le mutant de la GFP est la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, ou la Topaz.
- 40 23. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°18 ou SEQID N°20.
- 45 24. Acide nucléique codant pour l'une des protéines selon l'une des revendications 19 à 23.
- 50 25. Acide nucléique selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19.
26. Acide nucléique présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence selon la revendication 25.
27. Acide nucléique hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence selon la revendication 25.
28. Cellule comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 24 à 27.
29. Cellule exprimant une protéine selon l'une des revendications 19 à 23.

26. Acide nucléique présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence selon la revendication 25.

27. Acide nucléique hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence selon la revendication 25.

28. Cellule comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 24 à 27.

29. Cellule exprimant une protéine selon l'une des revendications 19 à 23.

30. Fragments de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.

31. Lysat de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.

32. Membranes de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.

33. Procédé de détermination de la modification de l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

-à mesurer l'interaction entre la protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

34. Procédé de détermination de la modification de l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie, et une protéine de fusion accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

-à mesurer le transfert d'énergie.

35. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, et la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion selon la revendication 22.

36. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la protéine de

30. Fragments de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.
31. Lysat de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.
32. Membranes de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.
33. Procédé de détermination de la modification de l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
 - à mesurer l'interaction entre la protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.
34. Procédé de détermination de la modification de l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion selon la revendication 19, et une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine, et une protéine donneur d'énergie ou une protéine accepteur d'énergie, ou une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
 - à mesurer le transfert d'énergie.
35. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, et la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion selon la revendication 22.
36. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion selon la revendication 20, et la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie substantielle de la YFP.
37. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.
38. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester et de la leptine (ou un ligand du

fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion selon la revendication 20, et la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie substantielle de la YFP.

37. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.

38. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester et de la leptine (ou un ligand du récepteur), est comparé à celui mesuré en présence du composé en absence de leptine (ou un ligand du récepteur).

39. Procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
- à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

40. Procédé selon l'une des revendications 34 et 35 caractérisé en ce que la protéine de fusion est une protéine de séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°12, SEQID N°14, SEQID N°18 ou SEQID N°20.

41. Procédé selon l'une des revendications 33 à 40 caractérisé en ce que les cellules sont traitées par un agent perméabilisant.

récepteur), est comparé à celui mesuré en présence du composé en absence de leptine (ou un ligand du récepteur).

5 39. Procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

10 -à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

15 40. Procédé selon l'une des revendications 34 et 35 caractérisé en ce que la protéine de fusion est une protéine de séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°12, SEQID N°14, SEQID N°18 ou SEQID N°20.

41. Procédé selon l'une des revendications 33 à 40 caractérisé en ce que les cellules sont traités par un agent perméabilisant.

20

Figure 1:

AS 01: 3'-teg-G*G*G C*C*C*G G*C A*C*C G*T*C*C T*T*C*G
 AS 02: 3'-teg-G*G*G*T*C A A G*C*C*C T*C*T G*T A*C*C*G
 AS 03: 3'-teg-G*C*C*C T*C*T G*T A*C*C G*C*C*C G*C*A*A
 AS 04: 3'-teg-T*A*C*C G*C*C*C G*C A A*T*T*T*C G A*G*A
 AS 05: 3'-teg-T*T*C*G A G A*G*C A*C*C G*T A A*T A*G*G
 AS 06: 3'-teg-G*A*A*T A*C G A*C*C*C*T A*C A*C G G*A*A
 AS 07: 3'-teg-A*C*A*C G G A A*T*C*T C*C*T*A A*T A*C*C
 AS 08: 3'-teg-C*T*C*C*T A A*T A*C*C G*C A A*A*T G*A*C
 AS 09: 3'-teg-C*C*G*C*A A A*T G A*C*C*G G G A*A T*A*A
 AS 10: 3'-teg-A*C*G G A*C A G*C*C*C T*T*G A*C*C G*T A*T A*A*A
 AS 11: 3'-teg-G*G*A*C A G*C*C*C T*T*G A*C*C G*T A*T A*A*A
 AS 12: 3'-teg-G*C*C*C T*T*G A*C*C G*T A*T A A*A G*A*A
 AS 13: 3'-teg-G*G*A A*C*A*C A A*C*C*G T*C*C*G T*T*A*C
 AS 14: 3'-teg-T*G*T A*C A*C G*T G*T A*C G*C*C G*T A*A
 AS 15: 3'-teg-G*C*C*T C*C*T G*T C*C*A G*C*C*G C*C*A*A
 AS 16: 3'-teg-G*G*A*C*C G A*C*A T*T*G C*A*C G*T C*T A*A*A

*: Thioéster

_: 2'O-Méthylation

teg: espaceur Triéthylenglycol

Figure 2

	10	20	30	40	50	60
OB-RGRP_humaine	-----MAG-VKALVALSFSGAIGLTFLMLGCALEDYGVYWPLFVLIFHAIS					
My47_humaine	-----MAG-IKALISLSFGGAIGLMFLMLGCALPIYNKYWPLFVLFFYILS					
yt02_C.elegans	MCCHIHQCFDCCSMKNTILAVAALAFAGVVGLTFLVLGCALPRYGTWTPMFVITFYVLS					
YJ14_Levure	-----MMEFKVSPITKIISLSGFLALGFLLVILSCAL--FHNYYPLEFDILIFLLA					
Consensus	MCCHIHQCF2222MAG2IKALI2LSF4GAIGLTFLMLGCALP3YG4YWPLFV24FY4LS					
	70	80	90	100	110	120
OB-RGRP_humaine	PIPHFTAKR-----VTYDSDATSSACRELAYFFTTGIVVSAFGFPVILARVAVIKWGACG					
My47_humaine	PIPYCIARR-----LVDDTDAMSNACKELAIFFTTGIVVSAFGLPIVFARAHLEWGACA					
yt02_C.elegans	PVPLLIARR-----EQEDMTGTN-ACIELALFITTTGIVISAFALPIVLAHAGTIAMSACF					
YJ14_Levure	PIPNITIFNAGNKYHTSDFMSDSSNTGQDLAHFLTGMLEVTSGIALPVVIFYHCQLIGHLSCT					
Consensus	PIP44IARRGNKYH44DDMDATSNAC4ELA4FLTGTGIVVSAF2LP2V2A2A4LI4WGAC4					
	130	140	150			
OB-RGRP_humaine	LVLAGNAVIFLTIQGFFLIFGRGDDFSWEQW-					
My47_humaine	LVLTGNTVIFATILGFFLVFGSKDDFSWQQW-					
yt02_C.elegans	LIFIANSENFSVIIFYERIFNGEDMNGMSLW-					
YJ14_Levure	MCMIGGLIIYSSIVIFKWFFKKDENEDDSLFG					
Consensus	LVLIGN42IFSTI4GFFLIFG44DDFSWS2WG					

Figure 3A

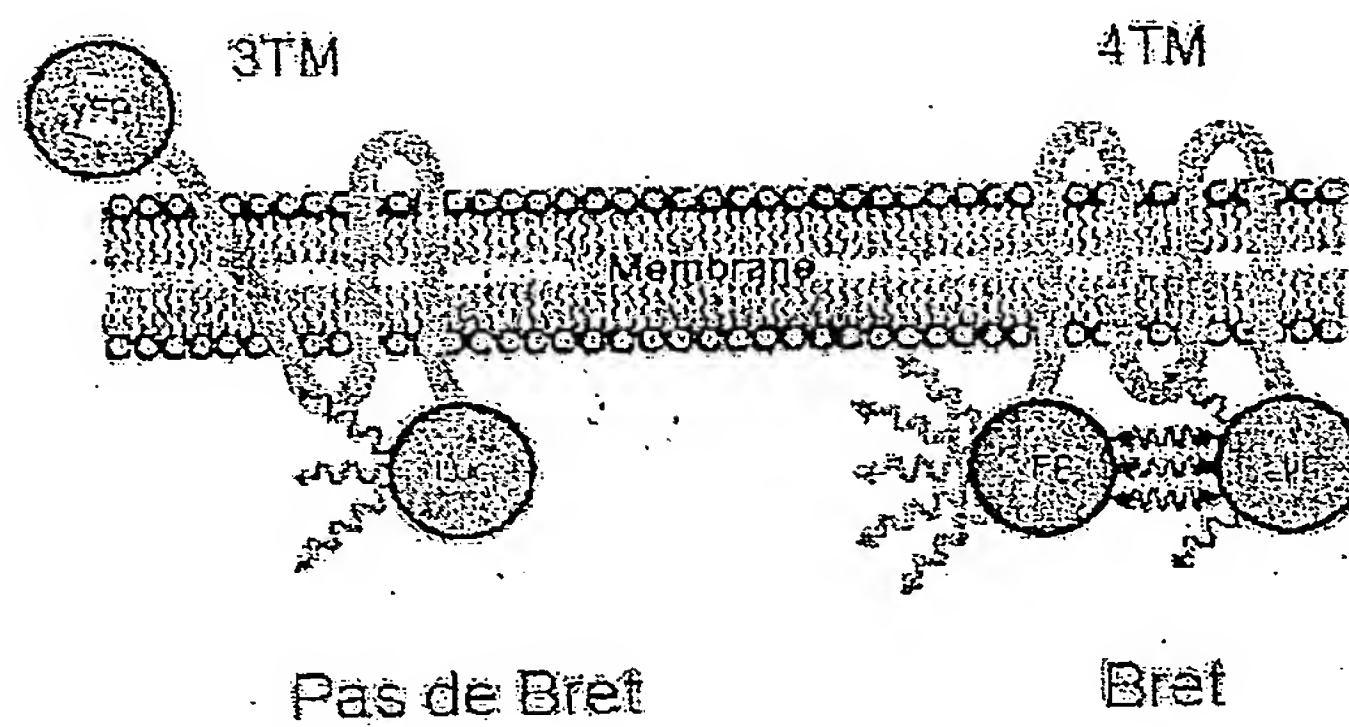
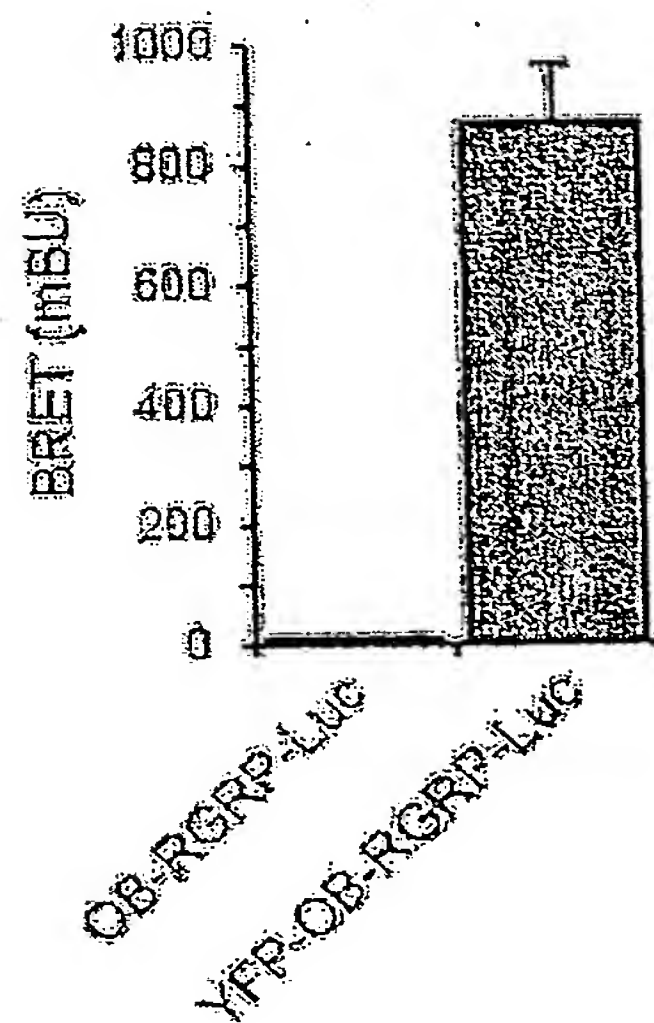
Nier  Clér

Figure 3B



4/12

Figure 4 A

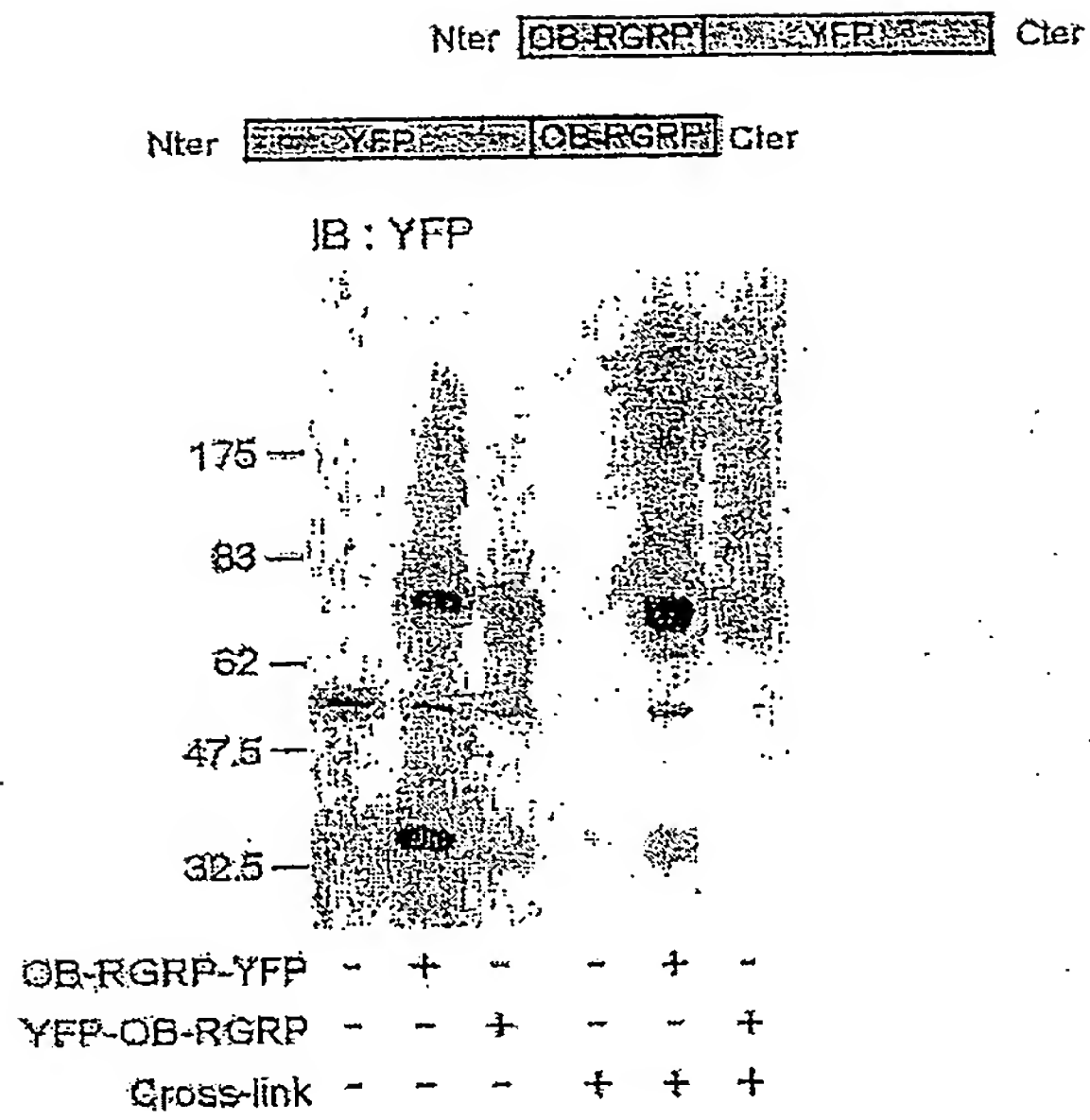


Figure 4B

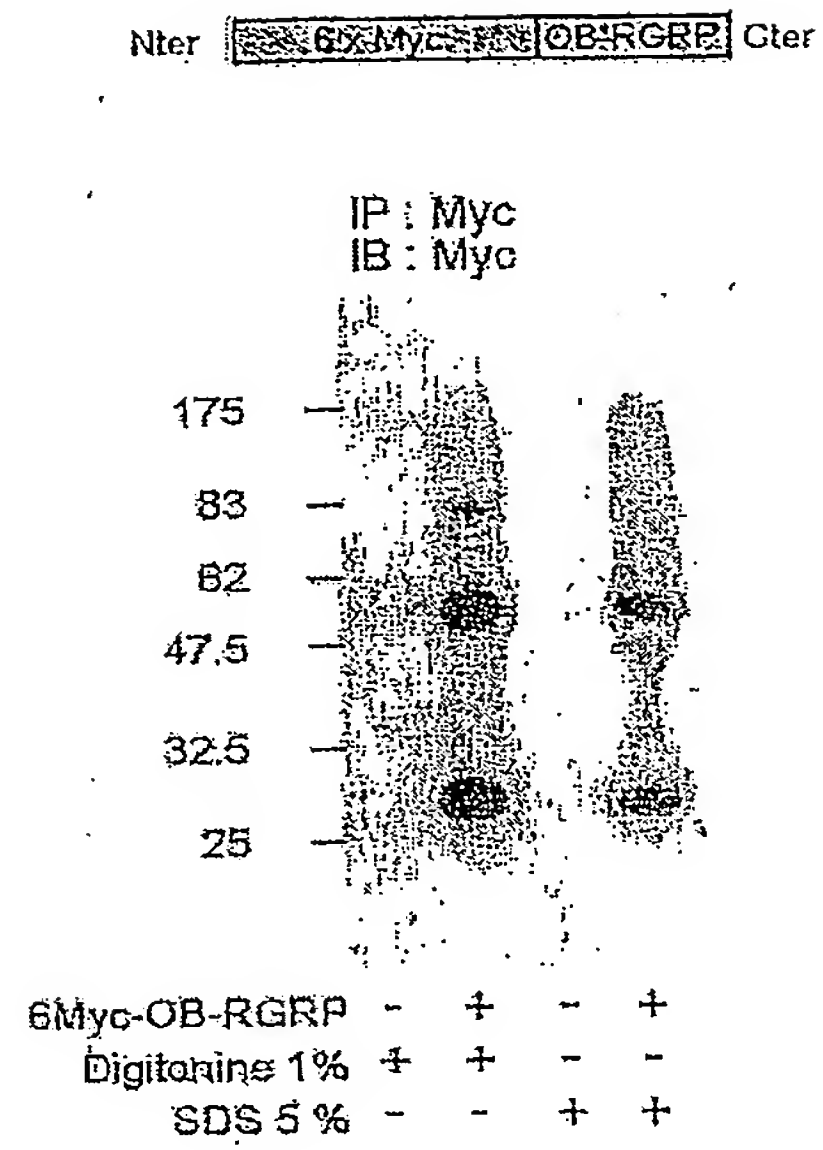


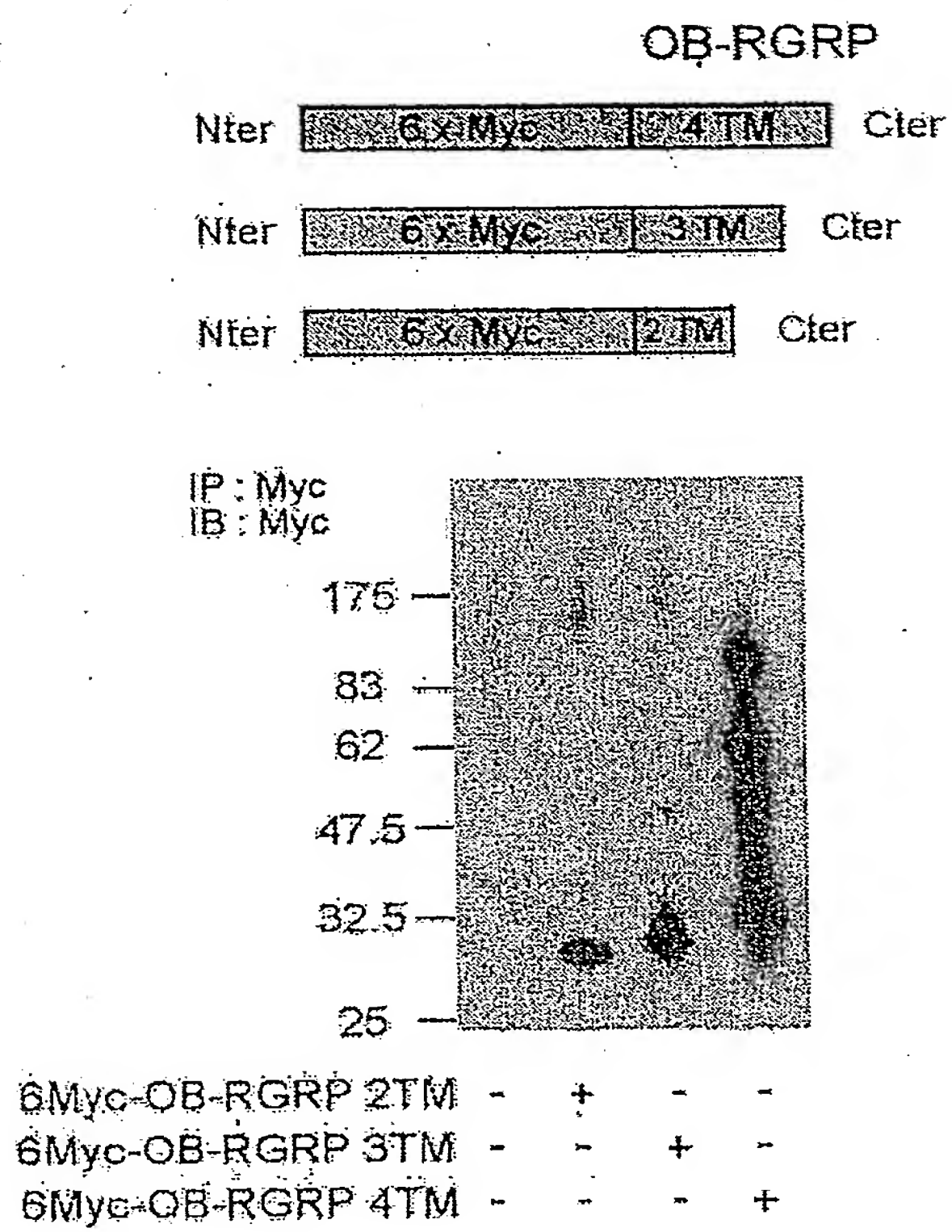
Figure 5

Figure 6 A

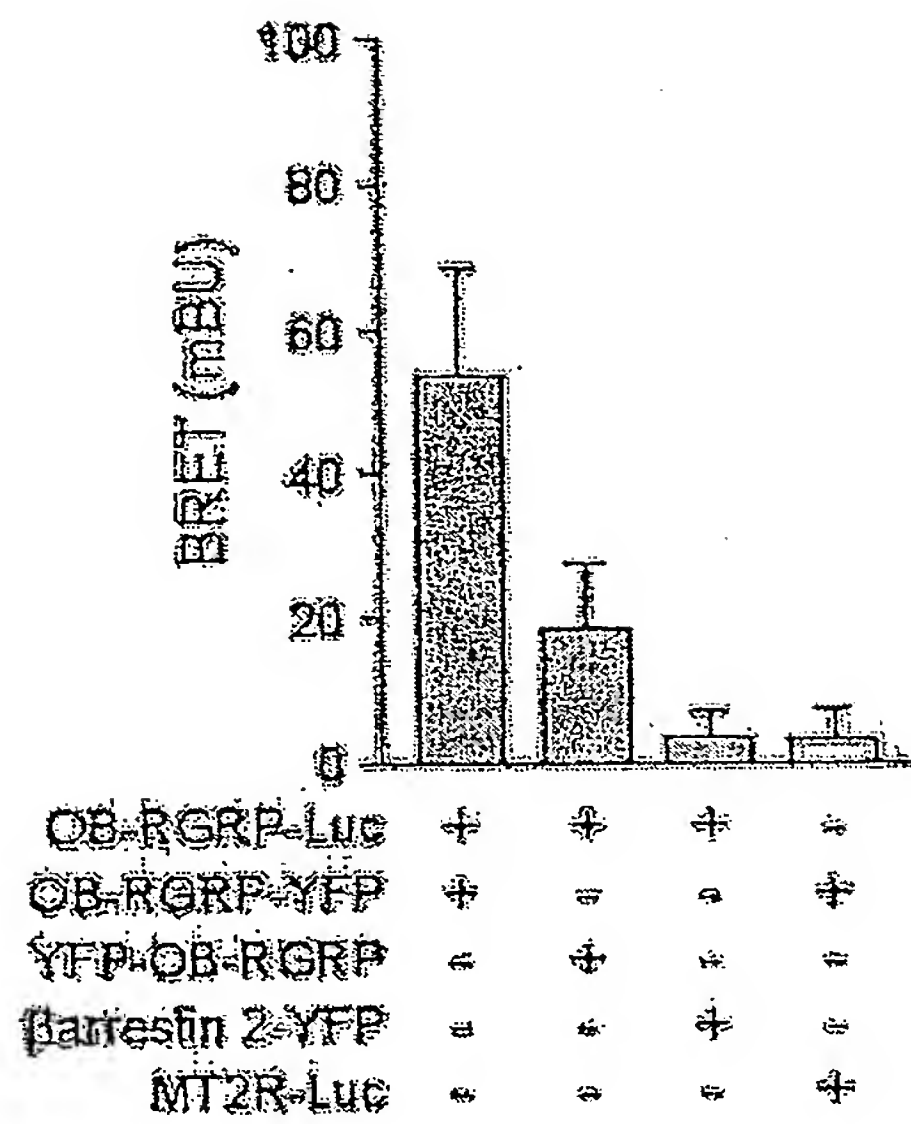


Figure 6B

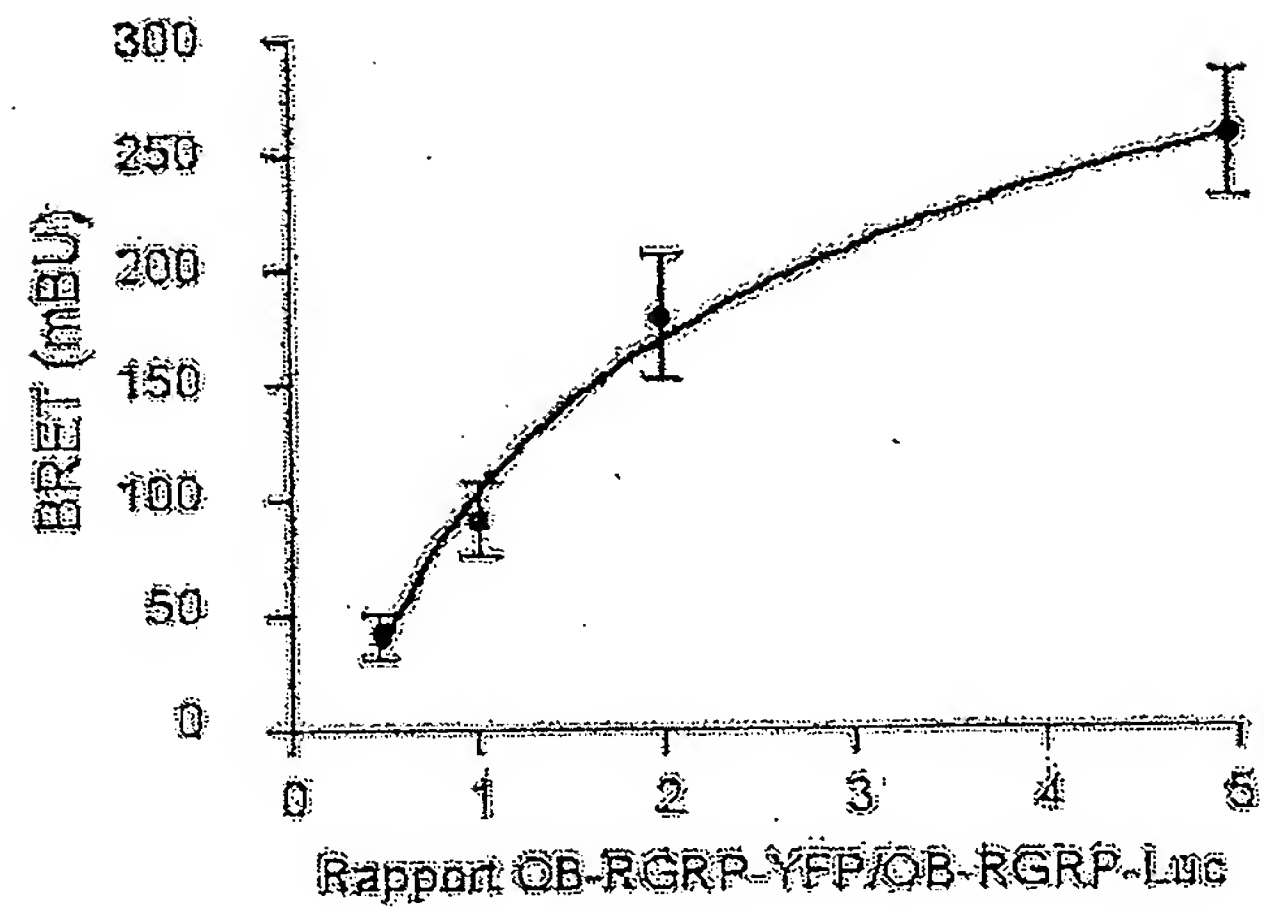


Figure 7

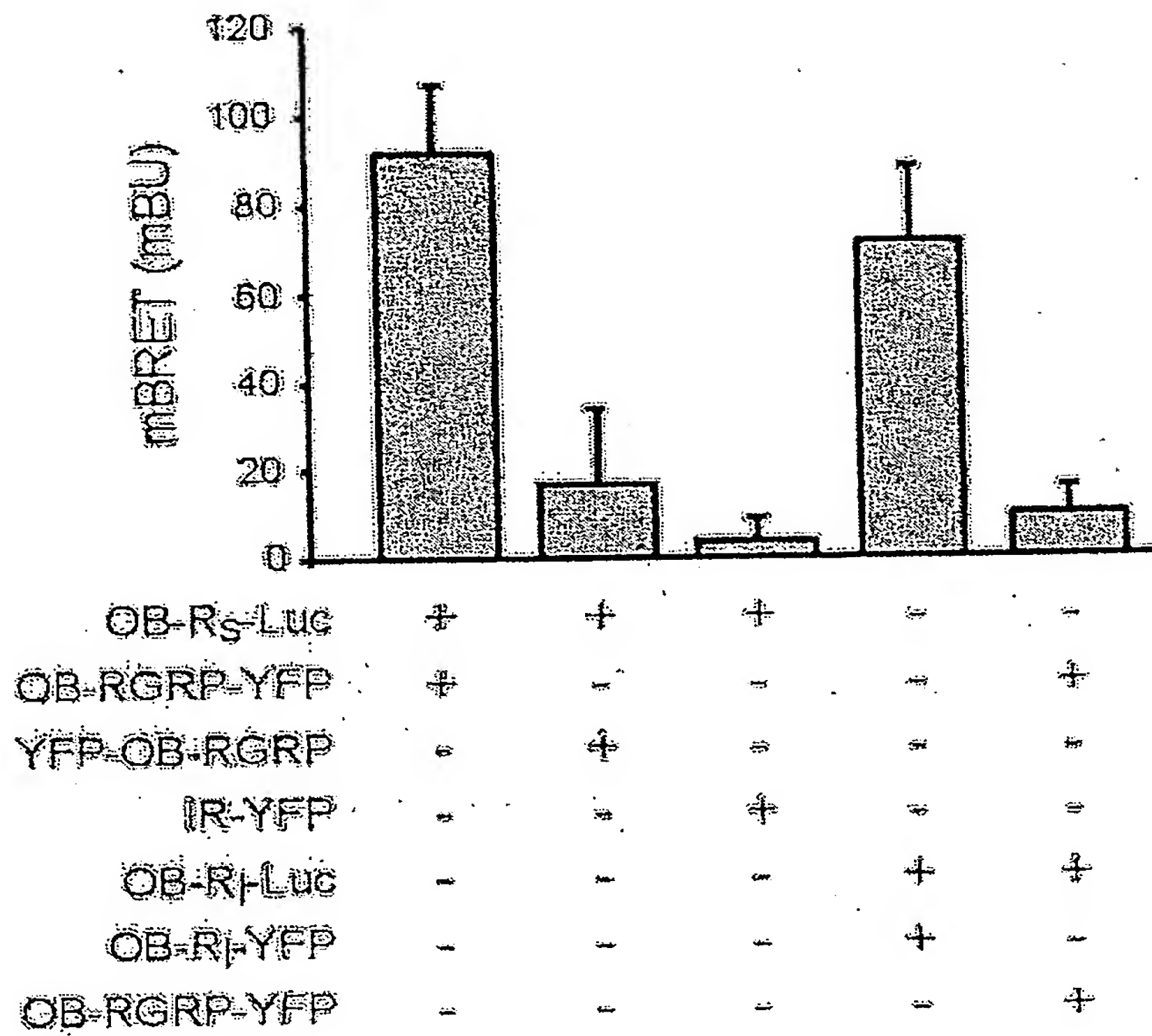


Figure 8 a

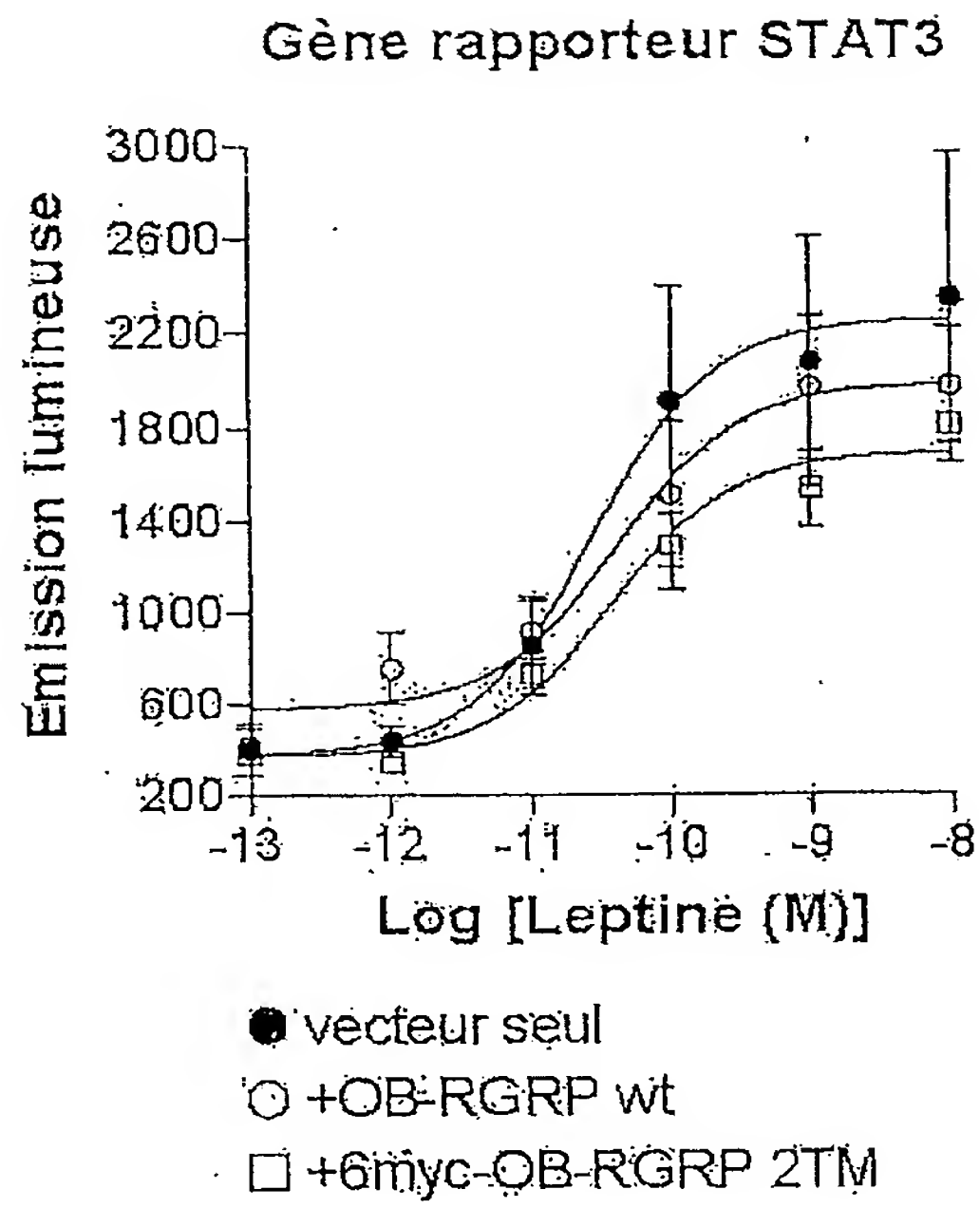


Figure 8b

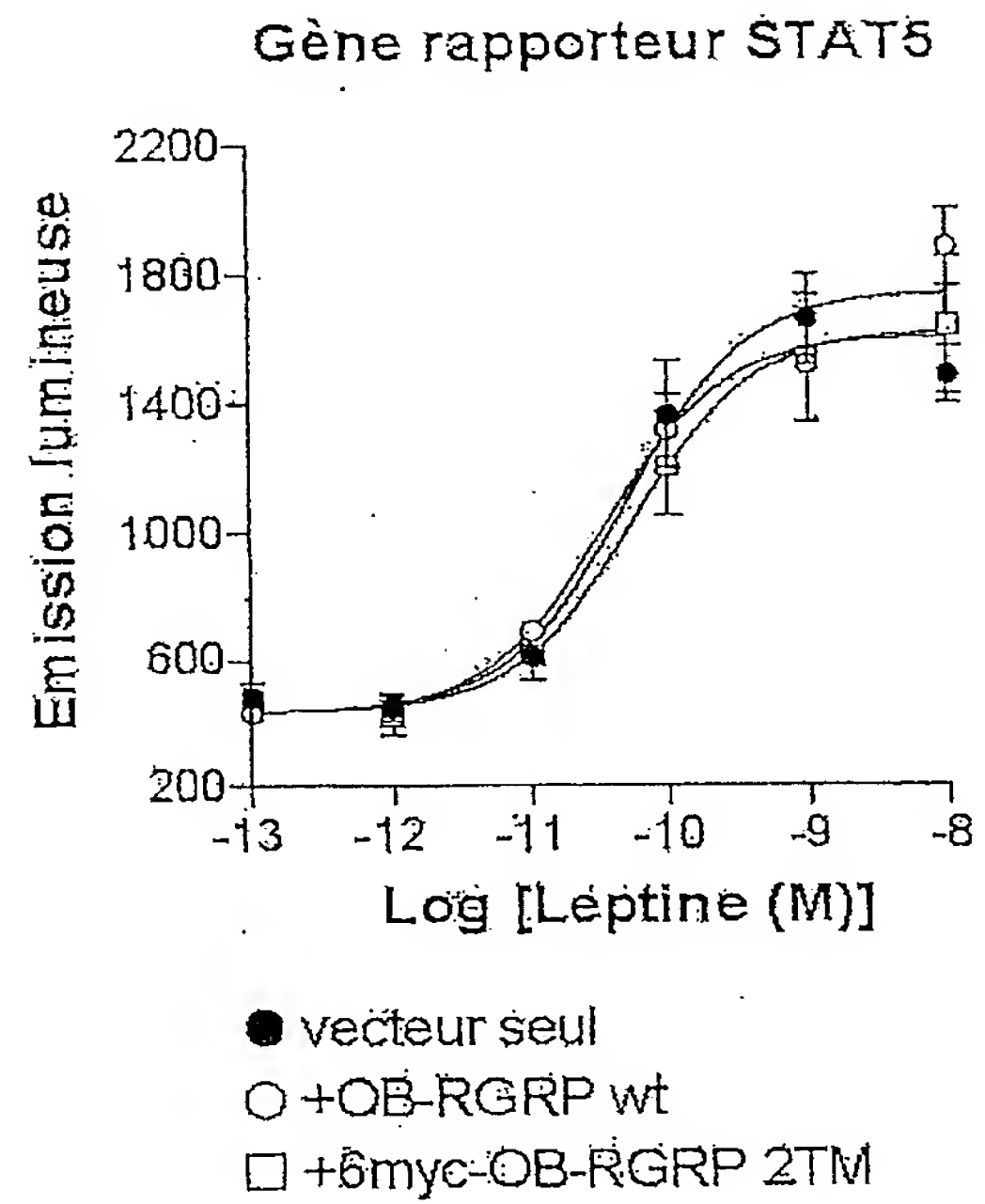


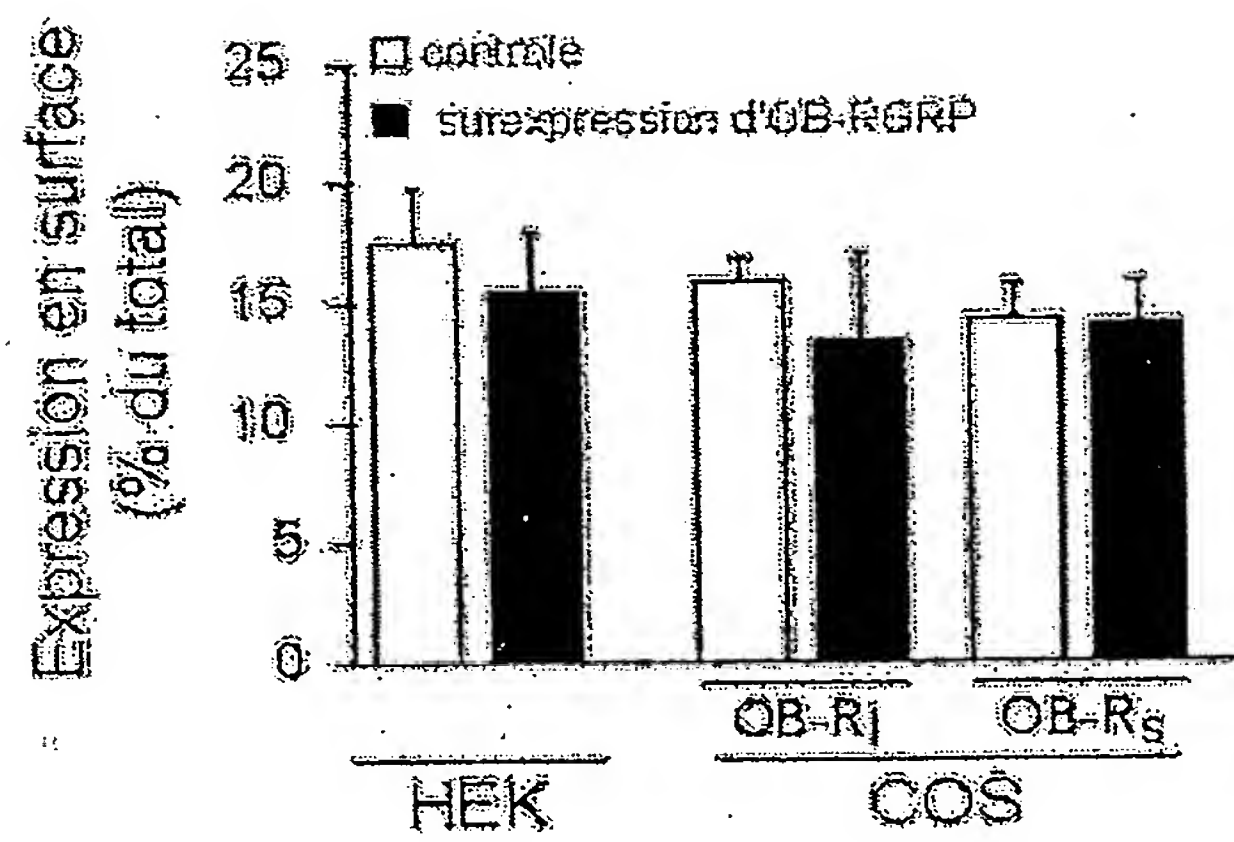
Figure 9

Figure 10a

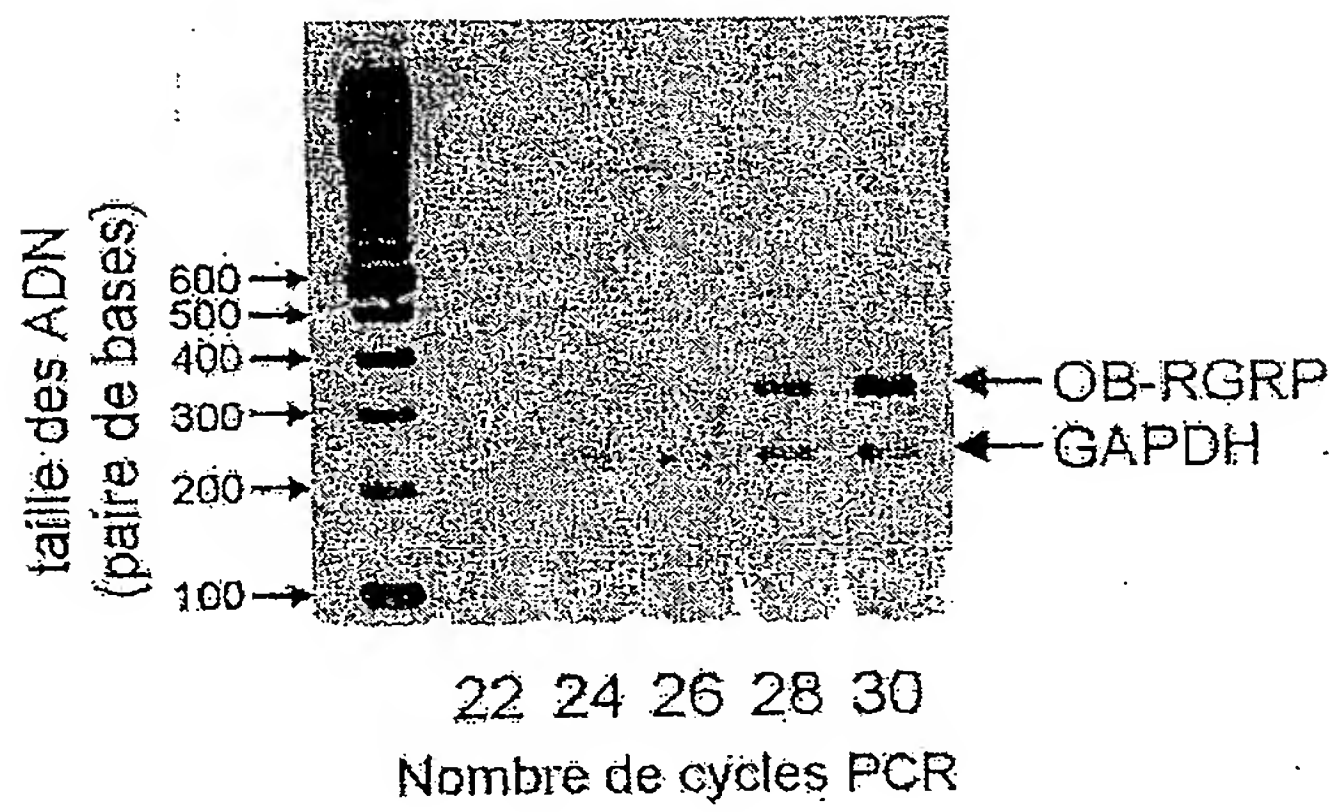


Figure 10b

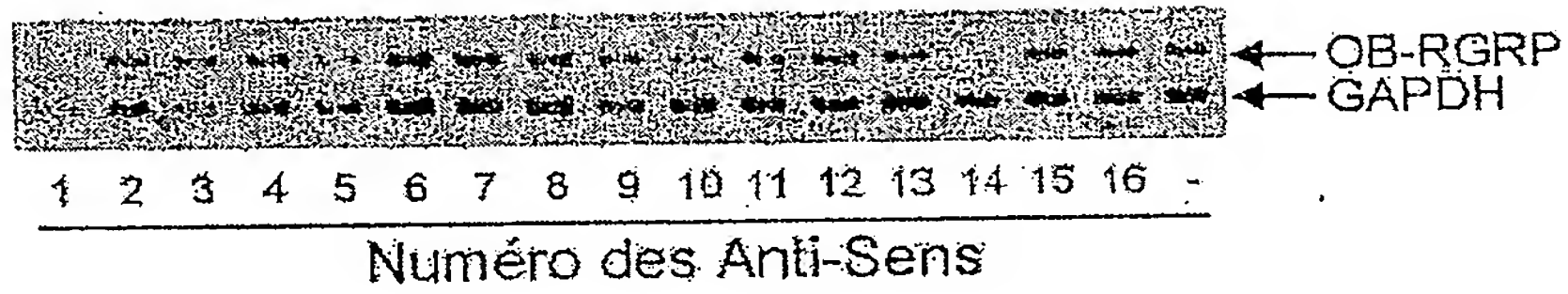
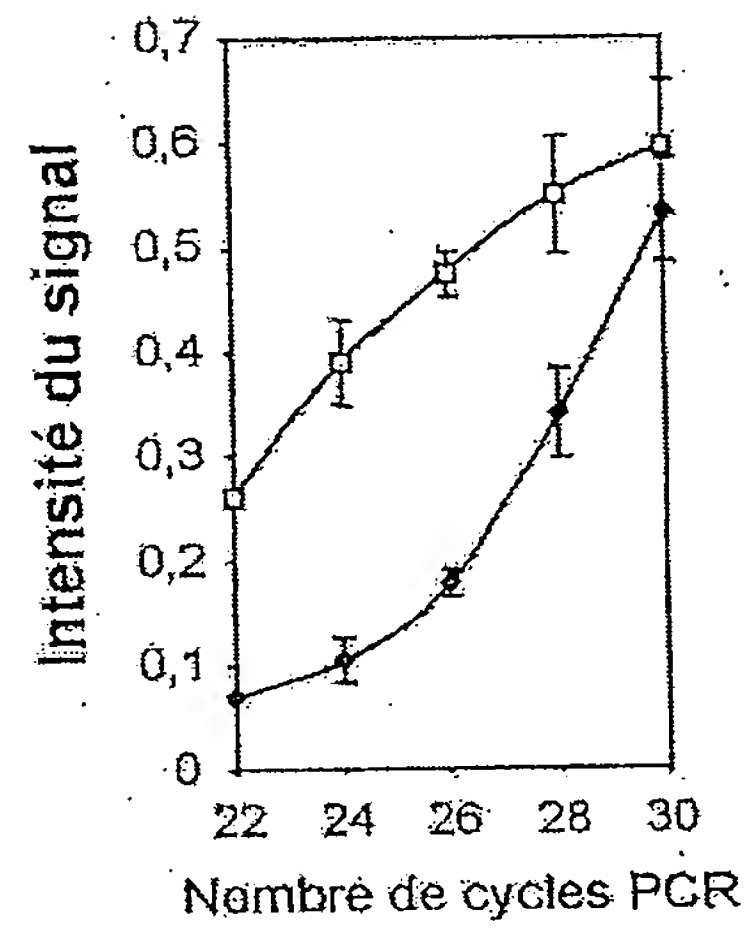


Figure 10c

Figure 11

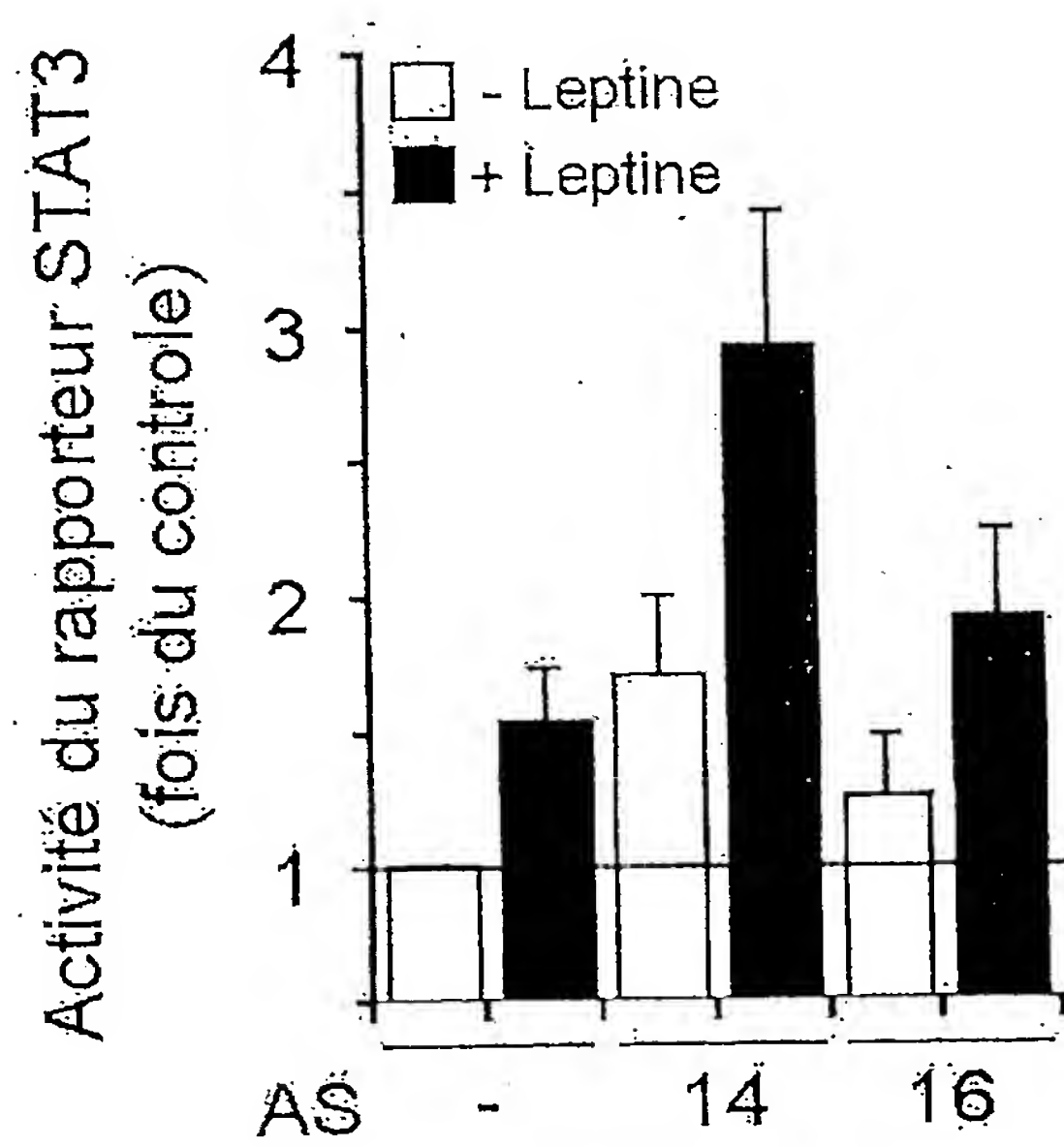
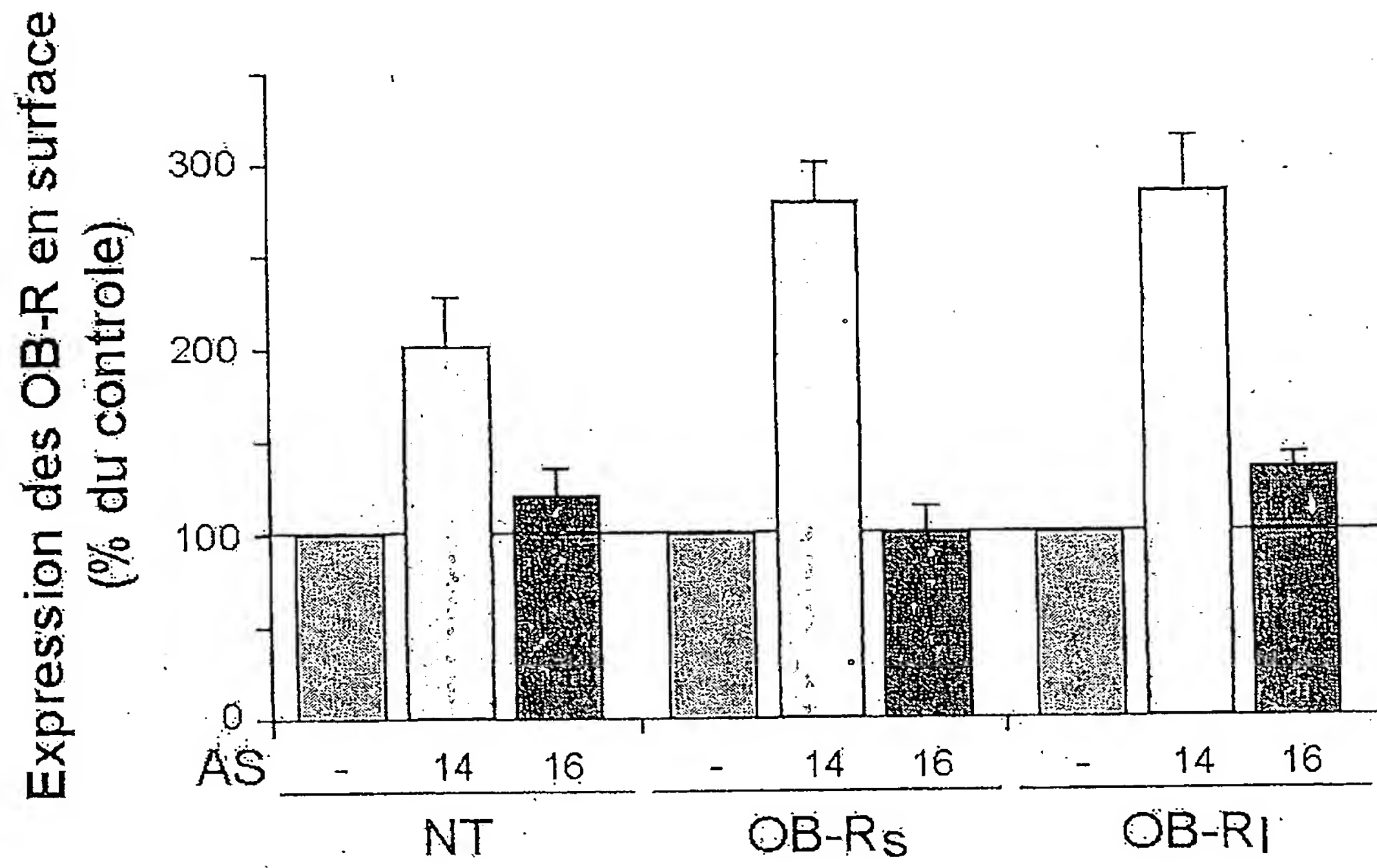


Figure 12



LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA

<120> ANTISENS OB RGRP

<130> ANTISENS OB RGRP

<140>

<141>

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 648

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cactttattc tgattacagt gcattgaatt tcttagaact catactatct gtatacatgt 60
gcacatgcgg cattttacta tgaaatttaa tatgctgggt tttttaatac ctttatatat 120
catgttcact ttaagaaaga cttcataagt aggagatgag ttttattctc agcaaataga 180
cctgtcaaat ttagattatg ttactcaaat tatgttactt gtttggctgt tcatgtagtc 240
acggtgctct cagaaaatat attaacgcag tcttgtaggc agctgccacc ttatgcagtg 300
catcgaaacc ttttgcttgg ggatgtgctt ggagaggcag ataacgctga agcaggcctc 360
tcatgacca ggaaggccgg ggtggatccc tctttgtgtt gtagtccatg ctattaaaag 420
tgtggccac agaccaagag cctcaacatt tcctagagcc ttattagaaa tgcagaatct 480
gaagccccac tctggacca ggacattttg atgagatcca aaggagtgt atgcacatga 540
aagtttgaga agcatcatca tagagaagta aacatcacac ccaacttcct tatctttcca 600
gtggctaaac cacttaacct ctctgggtgt tacctgctca tttgttta 648

```

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:antisens
AS14

<400> 2

aatgccgcat gtgcacatgt

20

<210> 3

<211> 396

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(396)

<400> 3

atg gcg ggc gtt aaa gct ctc gtg gca tta tcc ttc agt ggg gct att 48
 Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
 1 5 10 15

gga ctg act ttt ctt atg ctg gga tgt gcc tta gag gat tat ggc gtt 96
 Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val
 20 25 30

tac tgg ccc tta ttc gtc ctg att ttc cac gcc atc tcc ccc atc ccc 144
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

cat ttc att gcc aaa aga gtc acc tat gac tca gat gca acc agt agt 192
 His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
 50 55 60

gcc tgt cgg gaa ctg gca tat ttc ttc act act gga att gtt gtt tct 240
 Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

gcc ttt gaa ttt cct gtt att ctt gct cgt gtg gct gtg atc aaa tgg 288
 Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
 85 90 95

gga gcc tgc ggc ctt gtg ttg gca ggc aat gca gtc att ttc ctt aca 336
 Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
 100 105 110

att caa ggg ttt ttc ctt ata ttt gga aga gga gat gat ttt agc tgg 384
 Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

gag cag tgg tag 396
 Glu Gln Trp
 130

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val
 20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
 50 55 60

Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
 85 90 95

Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
 100 105 110

Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

Glu Gln Trp
 130

<210> 5

<211> 1359

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1359)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:OB RGRP
 LUC

<400> 5

atg gcg ggc gtt aaa gct ctc gtg gca tta tcc ttc agt ggg gct att 48

Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
 1 5 10 15

gga ctg act ttt ctt atg ctg gga tgt gcc tta gag gat tat ggc gtt 96
 Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val
 20 25 30

tac tgg ccc tta ttc gtc ctg att ttc cac gcc atc tcc ccc atc ccc 144
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

cat ttc att gcc aaa aga gtc acc tat gac tca gat gca acc agt agt 192
 His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
 50 55 60

gcc tgt cgg gaa ctg gca tat ttc ttc act act gga att gtt gtt tct 240
 Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

gcc ttt gga ttt cct gtt att ctt gct cgt gtg gct gtg atc aaa tgg 288
 Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
 85 90 95

gga gcc tgc ggc ctt gtg ttg gca ggc aat gca gtc att ttc ctt aca 336
 Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
 100 105 110

att caa ggg ttt ttc ctt ata ttt gga aga gga gat gat ttt agc tgg 384
 Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

gag cag tgg att ccg ggg gat cca ccg gct aga gcc acc atg acc agc 432
 Glu Gln Trp Ile Pro Gly Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser
 130 135 140

aag gtg tac gac ccc gag cag agg aag agg atg atc acc ggc ccc cag 480
 Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln
 145 150 155 160

tgg tgg gcc agg tgc aag cag atg aac gtg ctg gac agc ttc atc aac 528
 Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
 165 170 175

tac tac gac agc gag aag cac gcc gag aac gcc gtg atc ttc ctg cac 576
 Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His
 180 185 190

ggc aac gcc gct agc agc tac ctg tgg agg cac gtg gtg ccc cac atc 624

Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile
 195 200 205

gag ccc gtg gcc agg tgc atc atc ccc gat ctg atc ggc atg ggc aag 672
 Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys
 210 215 220

agc ggc aag agc ggc aac ggc agc tac agg ctg ctg gac cac tac aag 720
 Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys
 225 230 235 240

tac ctg acc gcc tgg ttc gag ctc ctg aac ctg ccc aag aag atc atc 768
 Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 245 250 255

ttc gtg ggc cac gac tgg ggc gcc tgc ctg gcc ttc cac tac agc tac 816
 Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr
 260 265 270

gag cac cag gac aag atc aag gcc atc gtg cac gcc gag agc gtg gtg 864
 Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val
 275 280 285

gac gtg atc gag agc tgg gac gag tgg cca gac atc gag gag gac atc 912
 Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile
 290 295 300

gcc ctg atc aag agc gag gag ggc gag aag atg gtg ctg gag aac aac 960
 Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
 305 310 315 320

ttc ttc gtg gag acc atg ctg ccc agc aag atc atg aga aag ctg gag 1008
 Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
 325 330 335

ccc gag gag ttc gcc gcc tac ctg gag ccc ttc aag gag aag ggc gag 1056
 Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu
 340 345 350

gtg aga aga ccc acc ctg agc tgg ccc aga gag atc ccc ctg gtg aag 1104
 Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys
 355 360 365

ggc ggc aag ccc gac gtg gtg cag atc gtg aga aac tac aac gcc tac 1152
 Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 370 375 380

ctg aga gcc agc gac gac ctg ccc aag atg ttc atc gag agc gac ccc 1200

Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 385 390 395 400

ggc ttc ttc agc aac gcc atc gtg gag ggc gcc aag aag ttc ccc aac 1248
 Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 405 410 415

acc gag ttc gtg aag gtg aag ggc ctg cac ttc agc cag gag gac gcc 1296
 Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala
 420 425 430

ccc gac gag atg ggc aag tac atc aag agc ttc gtg gag aga gtg ctg 1344
 Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 435 440 445

aag aac gag cag taa 1359
 Lys Asn Glu Gln
 450

<210> 6

<211> 452

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle:OB RGRP
 LUC

<400> 6

Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val
 20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
 50 55 60

Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
 85 90 95

Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
 100 105 110

Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125
 Glu Gln Trp Ile Pro Gly Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser
 130 135 140
 Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln
 145 150 155 160
 Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
 165 170 175
 Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His
 180 185 190
 Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile
 195 200 205
 Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys
 210 215 220
 Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys
 225 230 235 240
 Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 245 250 255
 Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr
 260 265 270
 Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile
 290 295 300
 Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
 325 330 335
 Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu
 340 345 350
 Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 370 375 380

Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 385 390 395 400

Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 405 410 415

Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala
 420 425 430

Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 435 440 445

Lys Asn Glu Gln
 450

<210> 7

<211> 1128

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1128)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:OB RGRP
 YFP

<400> 7

atg gcg ggc gtt aaa gct ctc gtg gca tta tcc ttc agt ggg gct att 48
 Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
 1 5 10 15

gga ctg act ttt ctt atg ctg gga tgt gcc tta gag gat tat ggc gtt 96
 Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val
 20 25 30

tac tgg ccc tta ttc gtc ctg att ttc cac gcc atc tcc ccc atc ccc 144
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

cat ttc att gcc aaa aga gtc acc tat gac tca gat gca acc agt agt 192

His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
 50 55 60

gcc tgt cgg gaa ctg gca tat ttc ttc act act gga att gtt gtt tct 240
 Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

gcc ttt gga ttt cct gtt att ctt gct cgt gtg gct gtg atc aaa tgg 288
 Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
 85 90 95

gga gcc tgc ggc ctt gtg ttg gca ggc aat gca gtc att ttc ctt aca 336
 Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
 100 105 110

att caa ggg ttt ttc ctt ata ttt gga aga gga gat gat ttt agc tgg 384
 Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

gag cag tgg att ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag gag ctg 432
 Glu Gln Trp Ile Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 130 135 140

ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac 480
 Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 145 150 155 160

ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac 528
 Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 165 170 175

ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg 576
 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 180 185 190

ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc gtg cag tgc ttc 624
 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe
 195 200 205

gcc cgc tac ccc gac cac atg cgc cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc 672
 Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 210 215 220

atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac 720
 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 225 230 235 240

ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg 768

Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 245 250 255

gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac 816
 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 260 265 270

atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat 864
 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr
 275 280 285

atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag atc 912
 Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile
 290 295 300

cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac cag 960
 Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 305 310 315 320

cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac 1008
 Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His
 325 330 335

tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc 1056
 Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg
 340 345 350

gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc 1104
 Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu
 355 360 365

ggc atg gac gag ctg tac aag taa 1128
 Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 370 375

<210> 8

<211> 375

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle:OB RGRP
 YFP

<400> 8

Met Ala Gly Val Lys Ala Leu Val Ala Leu Ser Phe Ser Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Glu Asp Tyr Gly Val

20 25 30
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Ile Phe His Ala Ile Ser Pro Ile Pro
 35 40 45
 His Phe Ile Ala Lys Arg Val Thr Tyr Asp Ser Asp Ala Thr Ser Ser
 50 55 60
 Ala Cys Arg Glu Leu Ala Tyr Phe Phe Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80
 Ala Phe Gly Phe Pro Val Ile Leu Ala Arg Val Ala Val Ile Lys Trp
 85 90 95
 Gly Ala Cys Gly Leu Val Leu Ala Gly Asn Ala Val Ile Phe Leu Thr
 100 105 110
 Ile Gln Gly Phe Phe Leu Ile Phe Gly Arg Gly Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125
 Glu Gln Trp Ile Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu
 130 135 140
 Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn
 145 150 155 160
 Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr
 165 170 175
 Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val
 180 185 190
 Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln Cys Phe
 195 200 205
 Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 210 215 220
 Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp
 225 230 235 240
 Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu
 245 250 255
 Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn
 260 265 270
 Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr

275		280		285
Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile				
290		295		300
Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln				
305		310		315 320
Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His				
	325		330	335
Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg				
	340		345	350
Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu				
	355		360	365
Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys				
	370		375	

<210> 9
 <211> 2691
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (2691)

<400> 9	
atg att tgt caa aaa ttc tgt gtg gtt ttg tta cat tgg gaa ttt att	48
Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile	
1 5 10 15	
tat gtg ata act gcg ttt aac ttg tca tat cca att act cct tgg aga	96
Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg	
20 25 30	
ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat gac tac ttc ctt	144
Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu	
35 40 45	
ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg aat gga cat tat	192
Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr	
50 55 60	

gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt act cac ttt tct 240
 Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser
 65 70 75 80

aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg agt gag caa gat 288
 Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp
 85 90 95

aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga aag aca ttt gtt 336
 Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val
 100 105 110

tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat gca aac tgg aac 384
 Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn
 115 120 125

ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc atc tgt tat gtg 432
 Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val
 130 135 140

gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac tat aag gtc cat 480
 Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His
 145 150 155 160

ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca cct ctg gtt ccc 528
 Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro
 165 170 175

caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc agt gtt cat gaa 576
 Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu
 180 185 190

tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa ctc aac gac act 624
 Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr
 195 200 205

ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta att ttc cag tca 672
 Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser
 210 215 220

cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag cct gat cca cca 720
 Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro
 225 230 235 240

tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat tta aag att tct 768
 Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser
 245 250 255

tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa tat caa gtg aaa 816
 Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys
 260 265 270

tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct gac aag att gtc 864
 Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val
 275 280 285

tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct ggg tct tcg tat 912
 Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr
 290 295 300

gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca gga atc tgg agt 960
 Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser
 305 310 315 320

gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat gtc ata tac ttt 1008
 Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe
 325 330 335

cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt tct ttt cac tgc 1056
 Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys
 340 345 350

atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa gag att gtt tgg 1104
 Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp
 355 360 365

tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag tat gat gtt gtg 1152
 Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val
 370 375 380

agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg aat gaa acc aaa 1200
 Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys
 385 390 395 400

cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc tgc aat gaa cat 1248
 Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His
 405 410 415

gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att gat gtc aat atc 1296
 Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile
 420 425 430

aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa atg act tgc aga 1344
 Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg
 435 440 445

tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc act ttg caa ttg 1392
 Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu
 450 455 460

agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att cca tct att cat 1440
 Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His
 465 470 475 480

ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt gat ggt ttt tat 1488
 Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr
 485 490 495

gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc tac aca atg tgg 1536
 Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp
 500 505 510

att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct cca cca aca tgt 1584
 Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
 515 520 525

gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca tcc agt gtg aaa 1632
 Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
 530 535 540

gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata tct tgg gaa aag 1680
 Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
 545 550 555 560

cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att cgc tat ggt tta 1728
 Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
 565 570 575

agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt tat gat gca aaa 1776
 Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
 580 585 590

tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt gca gtc tat gct 1824
 Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
 595 600 605

gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga tat tgg agt aat 1872
 Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
 610 615 620

tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata aaa gtt cct atg 1920
 Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
 625 630 635 640

aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat act atg aaa aag	1968
Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys	
645 650 655	
gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg aaa aat gac tca	2016
Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser	
660 665 670	
ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat act tcc tgc aat	2064
Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn	
675 680 685	
gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa ttc act ttc ctg	2112
Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu	
690 695 700	
tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc atc aat tca att	2160
Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile	
705 710 715 720	
ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca tgg cct atg agc	2208
Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser	
725 730 735	
aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct tta aac agc agt	2256
Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser	
740 745 750	
tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat tac aag cta atg	2304
Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met	
755 760 765	
tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat ggt gaa ata aaa	2352
Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys	
770 775 780	
tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat atc cat gat cat	2400
Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His	
785 790 795 800	
ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac cca ata ttt atg	2448
Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met	
805 810 815	
gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc act caa gat gat	2496
Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp	
820 825 830	

att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta att gtg cca gta 2544
 Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
 835 840 845

att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta tta ata tca cac 2592
 Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
 850 855 860

caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg aac ccc aag aat 2640
 Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
 865 870 875 880

tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga acg gac att ctt 2688
 Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp Ile Leu
 885 890 895

tga 2691

<210> 10
 <211> 896
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile
 1 5 10 15

Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg
 20 25 30

Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu
 35 40 45

Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr
 50 55 60

Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser
 65 70 75 80

Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp
 85 90 95

Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val
 100 105 110

Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn

115	120	125
Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val		
130	135	140
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His		
145	150	155 160
Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro		
165	170	175
Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu		
180	185	190
Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr		
195	200	205
Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser		
210	215	220
Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro		
225	230	235 240
Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser		
245	250	255
Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys		
260	265	270
Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val		
275	280	285
Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr		
290	295	300
Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser		
305	310	315 320
Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe		
325	330	335
Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys		
340	345	350
Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp		
355	360	365
Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val		

370

375

380

Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys
 385 390 395 400

Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His
 405 410 415

Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile
 420 425 430

Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg
 435 440 445

Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu
 450 455 460

Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His
 465 470 475 480

Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr
 485 490 495

Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp
 500 505 510

Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
 515 520 525

Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
 530 535 540

Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
 545 550 555 560

Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
 565 570 575

Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
 580 585 590

Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
 595 600 605

Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
 610 615 620

Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met

625 630 635 640
 Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
 645 650 655
 Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
 660 665 670
 Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
 675 680 685
 Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
 690 695 700
 Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
 705 710 715 720
 Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
 725 730 735
 Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
 740 745 750
 Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
 755 760 765
 Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
 770 775 780
 Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
 785 790 795 800
 Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
 805 810 815
 Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
 820 825 830
 Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
 835 840 845
 Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
 850 855 860
 Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
 865 870 875 880
 Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp Ile Leu

885

890

895

<210> 11

<211> 3705

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3705)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:OBR LUC

<400> 11

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc 96
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
 Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
 Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
 Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt 288
 Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg 336
 Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga 384
 Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat 432
 Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc 480
 Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac 528
 Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca 576
 Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
 180 185 190

cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc 624
 Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys
 195 200 205

agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa 672
 Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys
 210 215 220

ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta 720
 Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val
 225 230 235 240

att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag 768
 Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys
 245 250 255

cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat 816
 Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn
 260 265 270

tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa 864
 Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln
 275 280 285

tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct 912
 Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala
 290 295 300

gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct 960
 Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro
 305 310 315 320

ggg tct tgc tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca 1008
 Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro
 325 330 335

gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat 1056
 Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp
 340 345 350

gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt 1104
 Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val
 355 360 365

tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa 1152
 Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys
 370 375 380

gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag 1200
 Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln
 385 390 395 400

tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg 1248
 Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu
 405 410 415

aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc 1296
 Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys
 420 425 430

tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att 1344
 Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile
 435 440 445

gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa 1392
 Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
 450 455 460

atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc 1440
 Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
 465 470 475 480

act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att 1488
 Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
 485 490 495

cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt 1536
 Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
 500 505 510

gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc 1584
 Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
 515 520 525

tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct 1632
 Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
 530 535 540

cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca 1680
 Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
 545 550 555 560

tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata 1728
 Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
 565 570 575

tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att 1776
 Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
 580 585 590

cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt 1824
 Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
 595 600 605

tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt 1872
 Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
 610 615 620

gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga 1920
 Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
 625 630 635 640

tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata 1968
 Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
 645 650 655

aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat 2016
 Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
 660 665 670

act atg aaa aag gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg 2064
 Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
 675 680 685

aaa aat gac tca ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat 2112
 Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
 690 695 700

act tcc tgc aat gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa 2160
 Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
 705 710 715 720

ttc act ttc ctg tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc 2208
 Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
 725 730 735

atc aat tca att ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca 2256
 Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750

tgg cct atg agc aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct 2304
 Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765

tta aac agc agt tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat 2352
 Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780

tac aag cta atg tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat 2400
 Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800

ggt gaa ata aaa tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat 2448
 Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815

atc cat gat cat ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac 2496
 Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830

cca ata ttt atg gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc 2544
 Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845

act caa gat gat att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta 2592
 Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860

att gtg cca gta att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta 2640
 Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880

tta ata tca cac caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg 2688
 Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895

aac ccc aag aat tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga 2736
 Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910

acg gac att ctg gat cca ccg gct aga gcc acc atg acc agc aag gtg 2784
 Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser Lys Val
 915 920 925

tac gac ccc gag cag agg aag agg atg atc acc ggc ccc cag tgg tgg 2832
 Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp
 930 935 940

gcc agg tgc aag cag atg aac gtg ctg gac agc ttc atc aac tac tac 2880
 Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr
 945 950 955 960

gac agc gag aag cac gcc gag aac gcc gtg atc ttc ctg cac ggc aac 2928
 Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn
 965 970 975

gcc gct agc agc tac ctg tgg agg cac gtg gtg ccc cac atc gag ccc 2976
 Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro
 980 985 990

gtg gcc agg tgc atc atc ccc gat ctg atc ggc atg ggc aag agc ggc 3024
 Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly
 995 1000 1005

aag agc ggc aac ggc agc tac agg ctg ctg gac cac tac aag tac ctg 3072
 Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu
 1010 1015 1020

acc gcc tgg ttc gag ctc ctg aac ctg ccc aag aag atc atc ttc gtg 3120
 Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val
 1025 1030 1035 1040

ggc cac gac tgg ggc gcc tgc ctg gcc ttc cac tac agc tac gag cac 3168
 Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His
 1045 1050 1055

cag gac aag atc aag gcc atc gtg cac gcc gag agc gtg gtg gac gtg 3216
 Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val
 1060 1065 1070

atc gag agc tgg gac gag tgg cca gac atc gag gag gac atc gcc ctg 3264
 Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu
 1075 1080 1085

atc aag agc gag gag ggc gag aag atg gtg ctg gag aac aac ttc ttc 3312
 Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe
 1090 1095 1100

gtg gag acc atg ctg ccc agc aag atc atg aga aag ctg gag ccc gag 3360
 Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu
 1105 1110 1115 1120

gag ttc gcc gcc tac ctg gag ccc ttc aag gag aag ggc gag gtg aga 3408
 Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg
 1125 1130 1135

aga ccc acc ctg agc tgg ccc aga gag atc ccc ctg gtg aag ggc ggc 3456
 Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly
 1140 1145 1150

aag ccc gac gtg gtg cag atc gtg aga aac tac aac gcc tac ctg aga 3504
 Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg
 1155 1160 1165

gcc agc gac gac ctg ccc aag atg ttc atc gag agc gac ccc ggc ttc 3552
 Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe
 1170 1175 1180

ttc agc aac gcc atc gtg gag ggc gcc aag aag ttc ccc aac acc gag 3600
 Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu
 1185 1190 1195 1200

ttc gtg aag gtg aag ggc ctg cac ttc agc cag gag gac gcc ccc gac 3648
 Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp
 1205 1210 1215

gag atg ggc aag tac atc aag agc ttc gtg gag aga gtg ctg aag aac 3696
 Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn
 1220 1225 1230

gag cag taa 3705
 Glu Gln
 1235

<210> 12

<211> 1234

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: OBR LUC

<400> 12

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
 180 185 190

Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys
 195 200 205

Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys
 210 215 220

Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val
 225 230 235 240

Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys
 245 250 255

Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn
 260 265 270

Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln
 275 280 285

Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala
 290 295 300

Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro
 305 310 315 320

Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro
 325 330 335

Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp
 340 345 350

Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val
 355 360 365

Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys
 370 375 380

Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln
 385 390 395 400

Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu
 405 410 415

Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys
 420 425 430

Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile
 435 440 445

Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
 450 455 460

Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
 485 490 495

Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
 500 505 510

Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
 515 520 525

Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
 530 535 540

Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
 545 550 555 560

Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
 565 570 575

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
 580 585 590

Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
 595 600 605

Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
 610 615 620

Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
 625 630 635 640

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
 645 650 655

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
 660 665 670

Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
 675 680 685

Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
 690 695 700

Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
 705 710 715 720

Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
 725 730 735

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750

Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800

Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815

Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830

Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845

Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860

Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880

Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895

Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910

Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser Lys Val
 915 920 925

Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp
 930 935 940

Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr
 945 950 955 960

Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn
 965 970 975

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro
 980 985 990

Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly
 995 1000 1005

Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu
 1010 1015 1020

Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val
 025 1030 1035 1040
 Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His
 1045 1050 1055
 Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val
 1060 1065 1070
 Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu
 1075 1080 1085
 Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe
 1090 1095 1100
 Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu
 105 1110 1115 1120
 Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg
 1125 1130 1135
 Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly
 1140 1145 1150
 Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg
 1155 1160 1165
 Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe
 1170 1175 1180
 Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu
 185 1190 1195 1200
 Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp
 1205 1210 1215
 Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn
 1220 1225 1230
 Glu Gln

<210> 13
 <211> 3486
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(3486)

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: OBR YFP

<400> 13

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc 96
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
 Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
 Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
 Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt 288
 Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg 336
 Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga 384
 Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat 432
 Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc 480
 Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac	528
Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn	
165 170 175	
tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca	576
Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser	
180 185 190	
cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc	624
Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys	
195 200 205	
agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa	672
Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys	
210 215 220	
ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta	720
Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val	
225 230 235 240	
att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag	768
Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys	
245 250 255	
cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat	816
Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn	
260 265 270	
tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa	864
Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln	
275 280 285	
tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct	912
Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala	
290 295 300	
gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct	960
Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro	
305 310 315 320	
ggg tct tcg tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca	1008
Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro	
325 330 335	
gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat	1056
Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp	
340 345 350	

gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt	1104
Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val	
355 360 365	
tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa	1152
Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys	
370 375 380	
gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag	1200
Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln	
385 390 395 400	
tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg	1248
Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu	
405 410 415	
aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc	1296
Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys	
420 425 430	
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att	1344
Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile	
435 440 445	
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa	1392
Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys	
450 455 460	
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc	1440
Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser	
465 470 475 480	
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att	1488
Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile	
485 490 495	
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt	1536
Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser	
500 505 510	
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc	1584
Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly	
515 520 525	
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct	1632
Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser	
530 535 540	

cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca 1680
Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
545 550 555 560

tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata 1728
Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
565 570 575

tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att 1776
Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
580 585 590

cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt 1824
Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
595 600 605

tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt 1872
Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
610 615 620

gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga 1920
Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
625 630 635 640

tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata 1968
Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
645 650 655

aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat 2016
Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
660 665 670

act atg aaa aag gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg 2064
Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
675 680 685

aaa aat gac tca ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat 2112
Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
690 695 700

act tcc tgc aat gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa 2160
Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
705 710 715 720

ttc act ttc ctg tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc 2208
Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
725 730 735

atc aat tca att ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca 2256
 Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750

tgg cct atg agc aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct 2304
 Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765

tta aac agc agt tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat 2352
 Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780

tac aag cta atg tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat 2400
 Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800

ggt gaa ata aaa tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat 2448
 Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815

atc cat gat cat ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac 2496
 Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830

cca ata ttt atg gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc 2544
 Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845

act caa gat gat att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta 2592
 Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860

att gtg cca gta att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta 2640
 Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880

tta ata tca cac caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg 2688
 Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895

aac ccc aag aat tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga 2736
 Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910

acg gac att ctg gat cca ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag 2784
 Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu
 915 920 925

gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac 2832
 Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
 930 935 940

gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc 2880
 Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
 945 950 955 960

acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg 2928
 Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
 965 970 975

ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc gtg cag 2976
 Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln
 980 985 990

tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg cgc cag cac gac ttc ttc aag 3024
 Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys
 995 1000 1005

tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag 3072
 Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
 1010 1015 1020

gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac 3120
 Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
 1025 1030 1035 1040

acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac 3168
 Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
 1045 1050 1055

ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac 3216
 Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
 1060 1065 1070

gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc 3264
 Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
 1075 1080 1085

aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac 3312
 Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
 1090 1095 1100

tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac 3360
 Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
 1105 1110 1115 1120

aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag 3408
 Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
 1125 1130 1135

aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc 3456
 Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
 1140 1145 1150

act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa 3486
 Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 1155 1160

<210> 14

<211> 1161

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: OBR YFP

<400> 14

Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
145 150 155 160

Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
165 170 175

Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
180 185 190

Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys
195 200 205

Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys
210 215 220

Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val
225 230 235 240

Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys
245 250 255

Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn
260 265 270

Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln
275 280 285

Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala
290 295 300

Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro
305 310 315 320

Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro
325 330 335

Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp
340 345 350

Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val
355 360 365

Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys
370 375 380

Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln
385 390 395 400

Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu
 405 410 415

Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys
 420 425 430

Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile
 435 440 445

Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
 450 455 460

Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
 465 470 475 480

Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
 485 490 495

Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
 500 505 510

Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
 515 520 525

Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
 530 535 540

Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
 545 550 555 560

Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
 565 570 575

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
 580 585 590

Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
 595 600 605

Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
 610 615 620

Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
 625 630 635 640

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
 645 650 655

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
 660 665 670

Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
 675 680 685

Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
 690 695 700

Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
 705 710 715 720

Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
 725 730 735

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
 740 745 750

Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
 755 760 765

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
 770 775 780

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
 785 790 795 800

Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
 805 810 815

Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
 820 825 830

Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
 835 840 845

Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
 850 855 860

Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
 865 870 875 880

Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
 885 890 895

Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
 900 905 910

Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu
 915 920 925

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
 930 935 940

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
 945 950 955 960

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
 965 970 975

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln
 980 985 990

Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys
 995 1000 1005

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
 1010 1015 1020

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
 025 1030 1035 1040

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
 1045 1050 1055

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
 1060 1065 1070

Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
 1075 1080 1085

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
 1090 1095 1100

Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
 105 1110 1115 1120

Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
 1125 1130 1135

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
 1140 1145 1150

Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 1155 1160

<210> 15
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(396)

<400> 15

atg gca ggc atc aaa gct ttg att agt ttg tcc ttt gga gga gca atc	48
Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile	
1 5 10 15	
gga ctg atg ttt ttg atg ctt gga tgt gcc ctt cca ata tac aac aaa	96
Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys	
20 25 30	
tac tgg ccc ctc ttt gtt cta ttt ttt tac atc ctt tca cct att cca	144
Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro	
35 40 45	
tac tgc ata gca aga aga tta gtg gat gat aca gat gct atg agt aac	192
Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn	
50 55 60	
gct tgt aag gaa ctt gcc atc ttt ctt aca acg ggc att gtc gtg tca	240
Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser	
65 70 75 80	
gct ttt gga ctc cct att gta ttt gcc aga gca cat ctg att gag tgg	288
Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp	
85 90 95	
gga gct tgt gca ctt gtt ctc aca gga aac aca gtc atc ttt gca act	336
Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr	
100 105 110	
ata cta ggc ttt ttc ttg gtc ttt gga agc aat gac gac ttc agc tgg	384
Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp	
115 120 125	
cag cag tgg tga	396
Gln Gln Trp	
130	

<210> 16
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
 1 5 10 15
 Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
 20 25 30
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
 35 40 45
 Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50 55 60
 Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80
 Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
 85 90 95
 Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
 100 105 110
 Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125
 Gln Gln Trp
 130

<210> 17
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1359)

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:MY47 LUC

<400> 17

atg gca ggc atc aaa gct ttg att agt ttg tcc ttt gga gga gca atc 48
 Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
 1 5 10 15

gga ctg atg ttt ttg atg ctt gga tgt gcc ctt cca ata tac aac aaa 96
 Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
 20 25 30

tac tgg ccc ctc ttt gtt cta ttt ttt tac atc ctt tca cct att cca 144
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

tac tgc ata gca aga aga tta gtg gat gat aca gat gct atg agt aac 192
 Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50 55 60

gct tgt aag gaa ctt gcc atc ttt ctt aca acg ggc att gtc gtg tca 240
 Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

gct ttt gga ctc cct att gta ttt gcc aga gca cat ctg att gag tgg 288
 Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
 85 90 95

gga gct tgt gca ctt gtt ctc aca gga aac aca gtc atc ttt gca act 336
 Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
 100 105 110

ata cta ggc ttt ttc ttg gtc ttt gga agc aat gac gac ttc agc tgg 384
 Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

cag cag tgg cga ccg gtg gat cca ccg gct aga gcc acc atg acc agc 432
 Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser
 130 135 140

aag gtg tac gac ccc gag cag agg aag agg atg atc acc ggc ccc cag 480
 Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln
 145 150 155 160

tgg tgg gcc agg tgc aag cag atg aac gtg ctg gac agc ttc atc aac 528
 Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn
 165 170 175

tac tac gac agc gag aag cac gcc gag aac gcc gtg atc ttc ctg cac 576
 Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His
 180 185 190

ggc aac gcc gct agc agc tac ctg tgg agg cac gtg gtg ccc cac atc 624
 Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile
 195 200 205

gag ccc gtg gcc agg tgc atc atc ccc gat ctg atc ggc atg ggc aag 672
 Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys
 210 215 220

agc ggc aag agc ggc aac ggc agc tac agg ctg ctg gac cac tac aag 720
 Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys
 225 230 235 240

tac ctg acc gcc tgg ttc gag ctc ctg aac ctg ccc aag aag atc atc 768
 Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile
 245 250 255

ttc gtg ggc cac gac tgg ggc gcc tgc ctg gcc ttc cac tac agc tac 816
 Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr
 260 265 270

gag cac cag gac aag atc aag gcc atc gtg cac gcc gag agc gtg gtg 864
 Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val
 275 280 285

gac gtg atc gag agc tgg gac gag tgg cca gac atc gag gag gac atc 912
 Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile
 290 295 300

gcc ctg atc aag agc gag gag ggc gag aag atg gtg ctg gag aac aac 960
 Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn
 305 310 315 320

ttc ttc gtg gag acc atg ctg ccc agc aag atc atg aga aag ctg gag 1008
 Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu
 325 330 335

ccc gag gag ttc gcc gcc tac ctg gag ccc ttc aag gag aag ggc gag 1056
 Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu
 340 345 350

gtg aga aga ccc acc ctg agc tgg ccc aga gag atc ccc ctg gtg aag 1104
 Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys
 355 360 365

ggc ggc aag ccc gac gtg gtg cag atc gtg aga aac tac aac gcc tac 1152
 Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 370 375 380

ctg aga gcc agc gac .gac ctg .ccc aag atg ttc atc gag agc gac ccc 1200
 Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 385 390 395 400

ggc ttc ttc agc aac gcc atc gtg gag ggc gcc aag aag ttc ccc aac 1248
 Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 405 410 415

acc gag ttc gtg aag gtg aag ggc ctg cac ttc agc cag gag gac gcc 1296
 Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala
 420 425 430

ccc gac gag atg ggc aag tac atc aag agc ttc gtg gag aga gtg ctg 1344
 Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 435 440 445

aag aac gag cag taa 1359
 Lys Asn Glu Gln
 450

<210> 18

<211> 452

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle:MY47 LUC

<400> 18

Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
 20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50 55 60

Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
 85 90 95

Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr

100	105	110
Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp		
115	120	125
Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser		
130	135	140
Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln		
145	150	155
Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn		
	165	170
Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His		
	180	185
Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile		
	195	200
Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys		
	210	215
Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys		
	225	230
Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile		
	245	250
Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr		
	260	265
Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val		
	275	280
Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile		
	290	295
Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn		
	305	310
Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu		
	325	330
Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu		
	340	345
Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys		

355 360 365
 Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr
 370 375 380
 Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro
 385 390 395 400
 Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn
 405 410 415
 Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala
 420 425 430
 Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu
 435 440 445
 Lys Asn Glu Gln
 450

<210> 19
 <211> 1140
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1140)

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:MY47 YFP

<400> 19
 atg gca ggc atc aaa gct ttg att agt ttg tcc ttt gga gga gca atc 48
 Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
 1 5 10 15
 gga ctg atg ttt ttg atg ctt gga tgt gcc ctt cca ata tac aac aaa 96
 Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
 20 25 30
 tac tgg ccc ctc ttt gtt cta ttt ttt tac atc ctt tca cct att cca 144
 Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
 35 40 45
 tac tgc ata gca aga aga tta gtg gat gat aca gat gct atg agt aac 192

Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50 55 60

gct tgt aag gaa ctt gcc atc ttt ctt aca acg ggc att gtc gtg tca 240
 Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

gct ttt gga ctc cct att gta ttt gcc aga gca cat ctg att gag tgg 288
 Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
 85 90 95

gga gct tgt gca ctt gtt ctc aca gga aac aca gtc atc ttt gca act 336
 Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
 100 105 110

ata cta ggc ttt ttc ttg gtc ttt gga agc aat gac gac ttc agc tgg 384
 Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

cag cag tgg cga ccg gtg gat cca ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag 432
 Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys
 130 135 140

ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac 480
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 145 150 155 160

ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc 528
 Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 165 170 175

gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc 576
 Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 180 185 190

aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc 624
 Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly
 195 200 205

gtg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg cgc cag cac gac ttc 672
 Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe
 210 215 220

ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc 720
 Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 225 230 235 240

ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag 768

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 245 250 255

ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag 816
 Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 260 265 270

gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc 864
 Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 275 280 285

cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg 912
 His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 290 295 300

aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc 960
 Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 305 310 315 320

gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg 1008
 Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
 325 330 335

ccc gac aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc 1056
 Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 340 345 350

aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc 1104
 Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 355 360 365

ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa 1140
 Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 370 375 380

<210> 20

<211> 379

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle:MY47 YFP

<400> 20

Met Ala Gly Ile Lys Ala Leu Ile Ser Leu Ser Phe Gly Gly Ala Ile
 1 5 10 15

Gly Leu Met Phe Leu Met Leu Gly Cys Ala Leu Pro Ile Tyr Asn Lys
 20 25 30

Tyr Trp Pro Leu Phe Val Leu Phe Phe Tyr Ile Leu Ser Pro Ile Pro
 35 40 45

Tyr Cys Ile Ala Arg Arg Leu Val Asp Asp Thr Asp Ala Met Ser Asn
 50 55 60

Ala Cys Lys Glu Leu Ala Ile Phe Leu Thr Thr Gly Ile Val Val Ser
 65 70 75 80

Ala Phe Gly Leu Pro Ile Val Phe Ala Arg Ala His Leu Ile Glu Trp
 85 90 95

Gly Ala Cys Ala Leu Val Leu Thr Gly Asn Thr Val Ile Phe Ala Thr
 100 105 110

Ile Leu Gly Phe Phe Leu Val Phe Gly Ser Asn Asp Asp Phe Ser Trp
 115 120 125

Gln Gln Trp Arg Pro Val Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys
 130 135 140

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
 145 150 155 160

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
 165 170 175

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly
 180 185 190

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly
 195 200 205

Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe
 210 215 220

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
 225 230 235 240

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
 245 250 255

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys
 260 265 270

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 275 280 285

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val
 290 295 300

Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala
 305 310 315 320

Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu
 325 330 335

Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro
 340 345 350

Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala
 355 360 365

Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 370 375

<210> 21

<211> 1114

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

gtctggccttg ggcaggctgc ccggggccgtg gcaggaagcc ggaagcagcc gcggccccag 60
ttcgggagac atggcgggcg ttaaagctct cgtggcatta tccttcagtg gggctatttg 120
actgactttt cttatgctgg gatgtgcctt agaggattat ggcgtttact ggcccttatt 180
cgtcctgatt ttccacgcca tctcccccat ccccatcttc attgccaaaa gagtcaccta 240
tgactcagat gcaaccagta gtgcctgtcg ggaactggca tatttcttca ctactggaat 300
tgttgtttct gcctttggat ttccctgttat tcttgctcgt gtggctgtga tcaaattggg 360
agcctgcggc cttgtgttgg caggcaatgc agtcattttc cttacaattc aagggttttt 420
ccttatattt ggaagaggag atgatttttag ctgggagcag tggtagcact ttattctgat 480
tacagtgcac tgaatttctt agaactcata ctatctgtat acatgtgcac atgcggcatt 540
ttactatgaa atttaatatg ctgggttttt taataccttt atatatcatg ttcactttaa 600
gaaagacttc ataagtagga gatgagtttt attctcagca aatagacctg tcaaatttag 660
attatgttac tcaaattatg ttacttgttt ggctgttcat gtagtcacgg tgctctcaga 720
aaatatatta acgcagtctt gtaggcagct gccaccttat gcagtgcac gaaacctttt 780
gcttggggat gtgcttgagg aggcagataa cgctgaagca ggctctcat gaccaggaa 840
ggccgggggtg gatccctctt tgtgtttag tccatgctat taaaagtgtg gccacagac 900
caagagcctc aacatttcct agagccttat tagaaatgca gaatctgaag cccactctg 960
gaccaggac attttgatga gatccaaagg agttgtatgc acatgaaagt ttgagaagca 1020
tcatcataga gaagtaaaca tcacacccaa cttccttata ttccagtgg ctaaaccact 1080
taacctctct ggggtgttacc tgctcatttg tttta 1114

```


**BREVET D'INVENTION**
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

V s références pour ce dossier (facultatif)		FRAV2003/0005
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		03 01 5h3
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) OLIGONUCLEOTIDE ANTISENS INHIBANT L'EXPRESSION DE LA PROTEINE OB-RGRP ET PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES MODIFIANT L'INTERACTION ENTRE LA FAMILLE DE LA PROTEINE OB-RGRP ET LE RECEPTEUR DE LA LEPTINE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : AVENTIS PHARMA S.A. : 20 avenue Raymond Aron - 92160 ANTONY CEDEX (FR) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) : 101 rue de Tolbiac - 75654 PARIS CEDEX 13 (FR)		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	JOCKERS
	Prénoms	Ralf
Adresse	Rue	94 rue de Gometz
	Code postal et ville	91144 BURES SUR YVETTE
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	COUTURIER
	Prénoms	Cyril
Adresse	Rue	17 rue Bénard
	Code postal et ville	75014 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	UHLMANN
	Prénoms	Eugen
Adresse	Rue	Zum Talblick 31
	Code postal et ville	61479 GLASHÜTTEN
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) BOUVET Philippe		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

THIS PAGE BLANK (USPTO)